

①

運動による酸化ストレスと β -カロテンの関与

平成9年度

岡村浩嗣

目 次

	ページ
序論	1
第1章 運動時の酸化ストレスの指標および抗酸化物質の変化	
第1節 漸増負荷で疲労困憊に至る運動	4
第2節 20 km ランニング	21
第3節 トライアスロン	32
第4節 激運動の反復（合宿）	41
第2章 運動が 8-OHdG に及ぼす影響	
第1節 長時間の運動（イヌ組織およびリンパ球）	49
第2節 漸増負荷で疲労困憊に至る運動	57
第3節 20 km ランニング	64
第4節 激運動の反復（合宿）	69
第3章 β -カロテン補給の効果	
第1節 漸増負荷運動に対する影響（単回摂取）	75
第2節 漸増負荷運動に対する影響（3 週間摂取）	81
第3節 トライアスロンに対する影響	89
第4節 3.8 mg、4 週間摂取の影響	95
第5節 30 mg、4 週間摂取後の漸増負荷運動に対する影響	101
総括	113
謝辞	116
参考文献	117
本論文に直接関係する論文	124
本論文に間接的に関係する論文	125

略 語

8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine
CK	Creatine kinase
GOT	Aspartate aminotransferase
GPT	Alanine aminotransferase
HPLC	High performance liquid chromatography
LDH	Lactate dehydrogenase
LPO	Lipid peroxide
Mb	Myoglobin
$O_2^{\cdot -}$	Superoxide
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
VO_{2max}	Maximal oxygen uptake

序論

人々の健康の維持・増進にとって適度の運動はきわめて重要な要因である。スポーツは現代社会では文化活動の一分野として欠くことができなくなっており、競技力を向上するための栄養についての研究がさかんにおこなわれている。著者もこれまでに栄養処方についての研究をおこなった。すなわち、運動時の脂肪のエネルギー代謝を抑制しない糖質補給源としてフルクトースが有効であること¹⁾、フルクトースの継続摂取が肝臓と筋肉のグリコーゲン貯蔵を高めることから²⁾、フルクトースは、運動時に効果的な糖質であることを示唆した。また、運動した後、速やかに栄養補給することは筋肉たんぱく質の合成にとって効果的なことを認めた³⁾。運動することによって、①血漿および脳内で分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸との比の低下という、意識障害を伴う肝性脳症と類似した変化が起こること②血中の偽性伝達物質濃度が上昇することを認め、アミノ酸代謝の変化が運動時の中枢機能を低下させている可能性を指摘し、分岐鎖アミノ酸補給が疲労の軽減に適していることを示唆した^{4, 5)}。

一方、最近では趣味としてトライアスロンなどの激しいスポーツをおこなう人も増加しているが、過激な運動はかえって健康を害するおそれがある。また、競技スポーツにおいては、競技力を高めるために厳しいトレーニングがおこなわれ、とくに高いパフォーマンスを求める競技スポーツでは、運動がむしろ過剰になる場合すらある。

より激しい、より長時間の運動を継続することは、酸素消費量の増大にともない活性酸素種による組織傷害の危険性を増大させる^{6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)}。運動時には、局所的に低酸素状態に陥る組織においてキサンチンオキシダーゼ活性が亢進したり^{15, 16, 17, 18, 19)}、マクロファージや好中球によって^{20, 21, 22)}、活性酸素種の生成が増加すると考えられている。活性酸素種は、脂質過酸化^{10, 11, 23, 24, 25, 26)}、筋肉および肝臓における過酸化脂質の増加^{25, 26)}、筋肉傷害²³⁾、ミトコンドリア機能の低下¹⁰⁾など、種々の組織傷害に関与している。したがって、激しい運動時に増大する活性酸素種による傷害に対処するための研究が待たれている。

生体には活性酸素を処理する酵素系などの防御機構が備わっており、抗酸化栄養素もこの防御機構のひとつである。運動トレーニングは防御機構としての酵素系を高めることも報告されているが^{26, 27, 28, 29, 30, 31, 32)}、活性酸素の生成が防御能を上回る場合もあると考えられている。また、高齢者などでは防御機構が低下している可能性もある。したがって、運動時には適切な抗酸化栄養素の補給が必要と思われる。

運動による酸化的傷害に対する抗酸化栄養素の効果に関しては数多くの研究がある^{6, 24, 33, 34, 35, 36, 37, 38)}。特に、 α -トコフェロールとアスコルビン酸の効果が広く研究され、傷害の軽減に有効なことが示されている^{24, 35, 36, 38)}。また、花粉の抽出物³⁹⁾や superoxide dismutase (SOD)⁴⁰⁾にも効果のあることが報告されている。 β -カロテンは一重項酸素の強力なスカベンジャーであり⁴¹⁾、近年、抗酸化能が注目されている抗酸化栄養素である^{42, 43)}。しかし、運動時の酸化ストレスに対する β -カロテンの影響については、ほとんど明らかにされていない。

酸化ストレスを受ける生体成分としては脂質、たんぱく質がよく研究されているが、DNA も活性酸素種によって傷害される生体成分である^{44, 45, 46, 47, 48, 49)}。核酸の酸化傷害に対する運動の影響については、60% VO_2max で1時間の運動を3日間おこなっても⁵⁰⁾、65% VO_2max で90分間の運動を3日間おこなっても⁵¹⁾、8-hydroxyguanosine (8-OHG)の尿中排泄が変化しなかったことから、この程度の運動ではRNAの酸化的損傷は起きないことが報告されている。一方、白血球において、DNAは運動によって酸化損傷を受け^{52, 53)}、 α -トコフェロールがその傷害を軽減するという報告がある⁵²⁾。DNAは遺伝情報の保存、伝達という生物にとってきわめて重要な機能をもっているため、運動によって体内に増加した活性酸素がDNAを損傷するのかどうかは、非常に重要な研究課題である。DNAの酸化的傷害は最近、全身レベルでの傷害が8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の尿中排泄量を指標として測定され、組織レベルでの傷害がDNA中の8-OHdG含量を指標として測定されるようになった^{46, 54, 55, 56, 57)}。しかしながら、運動が8-OHdGに及ぼす影響についてはこれまでのところ明らかにされていない。DNAはhydroxy radicalによって酸化傷害を受けるが、malondialdehyde (MDA)や⁵⁸⁾、一重項酸素によっても傷害される^{42, 59)}。 β -カロテンが一重項酸素のスカベンジャーであることを考えると⁴¹⁾、運

動による DNA の酸化傷害に対する β -カロテンの効果は興味あることである。

そこで本研究では、従来の酸化的傷害の指標に 8-OHdG を加えて、運動による活性酸素傷害に対する β -カロテンの影響を検討することを目的とした。

第 1 章では、強度および時間の異なる種々の運動において、酸化ストレスの指標と抗酸化ビタミンの変化をヒトを対象として検討した。第 1 節では 30 分程度で一過性の疲労困憊に至る運動の影響を、第 2 節では 20 km ランニングの影響を、第 3 節ではトライアスロンの影響を検討した。そして、第 4 節では平均 30 km のランニングを連日おこなう合宿の影響を検討した。酸化ストレスは血中の逸脱物および血中 thiobarbiturate reactive substances (TBARS)、lipid peroxide (LPO) を指標として検討した。また、第 1 節と第 2 節では、体内から TBARS が除去される経路のひとつである尿中 TBARS 排泄を測定し、血中 TBARS 濃度との関係を検討した。

第 2 章では運動が 8-OHdG に及ぼす影響についてまとめた。第 1 節ではイヌを研究対象として、組織およびリンパ球の DNA 中の 8-OHdG 含量に及ぼす運動の影響を検討した。第 2 節から第 4 節では、時間と強度の異なる運動の影響を検討した。第 2 節では 30 分程度で一過性の疲労困憊に至る運動を、第 3 節では 20 km ランニングを、そして、第 4 節ではトライアスロンを調査対象とし、尿中 8-OHdG 排泄に及ぼす影響をまとめた。

そして、第 3 章では β -カロテン補給の影響について、第 1 節では一過性の疲労困憊に至る運動の直前に補給した影響を検討し、第 2 節では 3 週間継続摂取したときの影響を同じく一過性に疲労困憊に至る運動において検討した。第 3 節ではトライアスロン選手を対象として、競技の前 10~20 日間摂取した影響を検討した。そして、第 3 節と第 4 節では 8-OHdG の尿中排泄に及ぼす影響を日常的な量を摂取した場合（第 3 節）と、大量に摂取した場合（第 4 節）について検討した結果をまとめた。

第1章 運動時の酸化ストレスの指標および抗酸化物質の変化

第1節 漸増負荷で疲労困憊に至る運動

漸増負荷で一過性に疲労困憊に至る運動が、酸化ストレスの指標および抗酸化ビタミンに及ぼす影響を検討した。運動時の酸化ストレスに対する抗酸化能はトレーニングされているか否かが影響するので^{29, 60)}、本研究では鍛練者と非鍛練者において検討した。

研究方法 (Fig. 1-1-1)

研究1

対象；日常定期的に長距離ランニング運動を実施している健康で喫煙習慣のない男性11名を対象とした。対象者は、年齢 20.7 ± 0.5 才、身長 170.0 ± 0.02 cm、体重 58.6 ± 1.4 kg、最大酸素摂取量は 60.7 ± 0.7 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷方法；トレッドミルを用い、傾斜0%で180 m/minのスピードから開始し、2分ごとに10 m/min増加させて疲労困憊に至るまでおこなった。

採血；運動前および運動の直後、3時間後および24時間後に採血した。

測定項目；血漿 TBARS (TBA 法、過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株)、LPO (デタミナーLPO、協和発酵)、CK (CPK-II テストワコー、和光純薬工業株)、ミオグロビン (ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ)、ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸 (HPLC 法)、 β -カロテン (HPLC 法)⁶¹⁾濃度を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。P<0.05 を有意とした。

研究2

対象；日常定期的に運動を実施していない、健康で喫煙習慣のない男性7名を対象

とした。対象者は、年齢 19.8 ± 0.3 才、身長 172.0 ± 2.9 cm、体重 61.9 ± 3.4 kg、最大酸素摂取量は 37.5 ± 2.2 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷方法；自転車エルゴメーターを用い3分間の座位安静の後、20Wで4分間のウォーミングアップをおこない、その後3分ごとに20Wの負荷漸増法により疲労困憊に至るまでおこなった。疲労困憊による運動中止時点は、対象者の自覚的運動強度と本人の申し出により決定した。

採血および採尿；運動前および運動の直後、24時間後、48時間後、72時間後に採血した。また、運動前日の全尿と運動後3日目までの全尿を24時間ごとに採取した。

測定項目；血漿 TBARS（TBA 法、過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業(株)）、LPO（デタミナーLPO、協和発酵）、LDH（LDH-HR、和光純薬工業(株)）、CK（CPK-II テストワコー、和光純薬工業(株)）、GOT（GOT-UV テストワコー、和光純薬工業(株)）、GPT（GPT-UV テストワコー、和光純薬工業(株)）、ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸（HPLC 法）、 β -カロテン（HPLC 法）、 α -トコフェロール（HPLC 法、⁶²⁾、アスコルビン酸（HPLC 法）の濃度を測定した。また、尿中 TBARS、クレアチニン（クリニメイト CRE キット、第一化学）濃度を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。P<0.05 を有意とした。

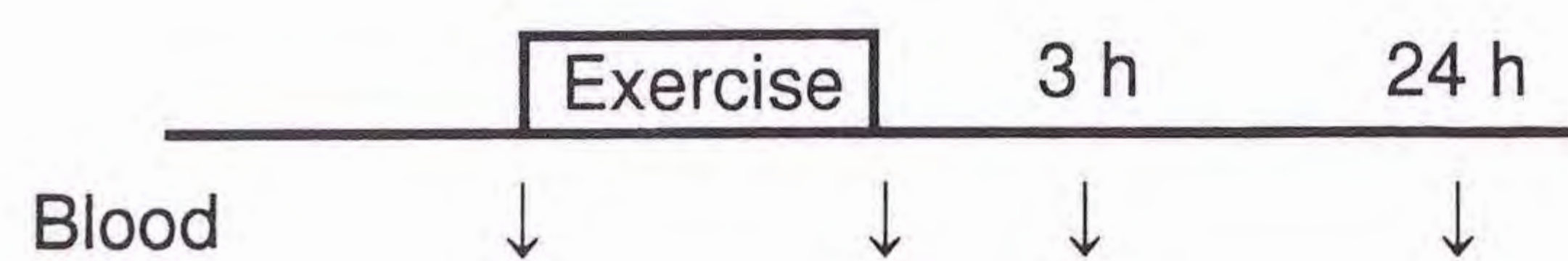
研究結果

研究 1

運動時間および最大心拍数

運動負荷実験中の最大心拍数は 199.7 ± 1.0 bpm だった。疲労困憊に至るまでの

Study 1. Trained subjects, treadmill running until exhaustion.



Study 2. Untrained subjects, cycle ergometer until exhaustion.

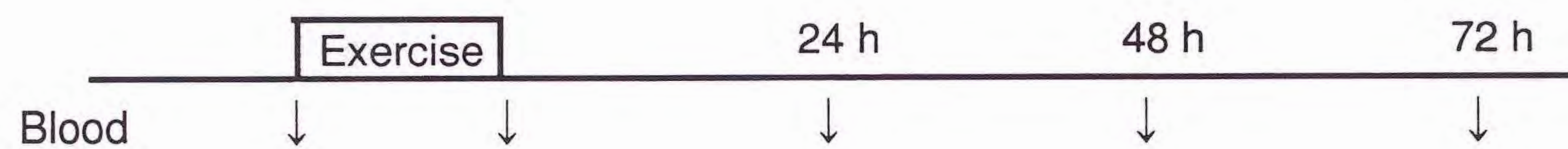


Fig. 1-1-1 Outline of the protocol

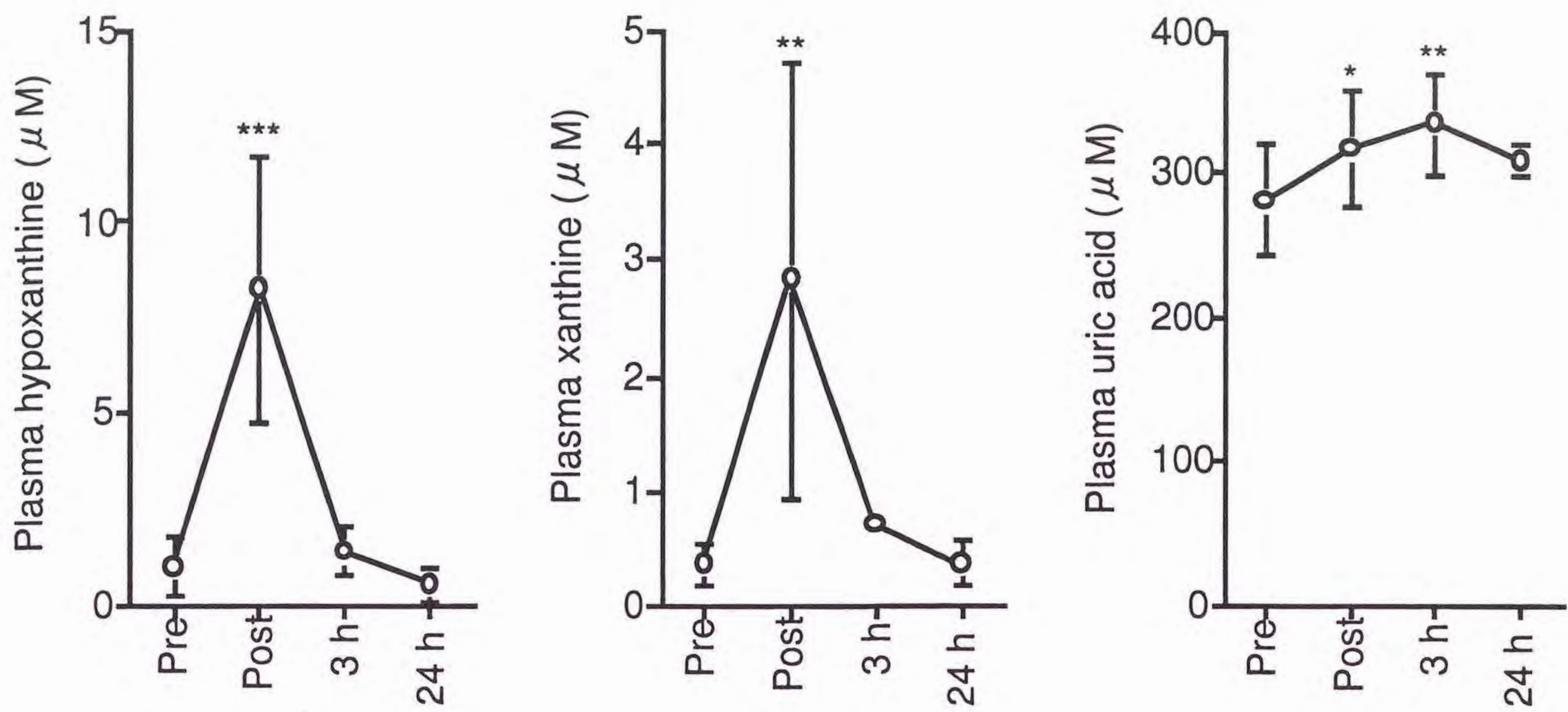


Fig 1-1-2 Plasma hypoxanthine, xanthine, and LPO in trained subjects. Means \pm SD for 5 subjects. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs pre.

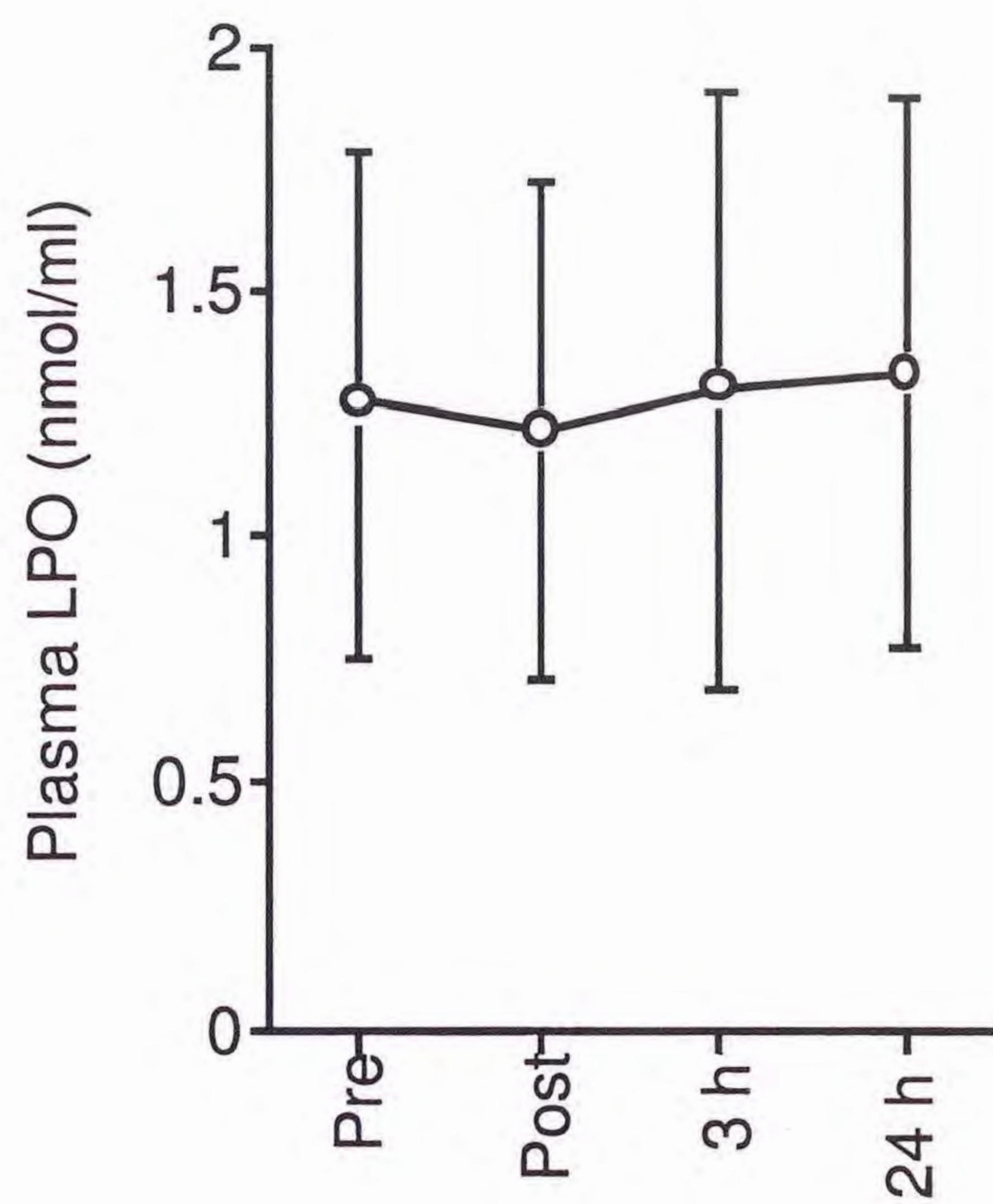
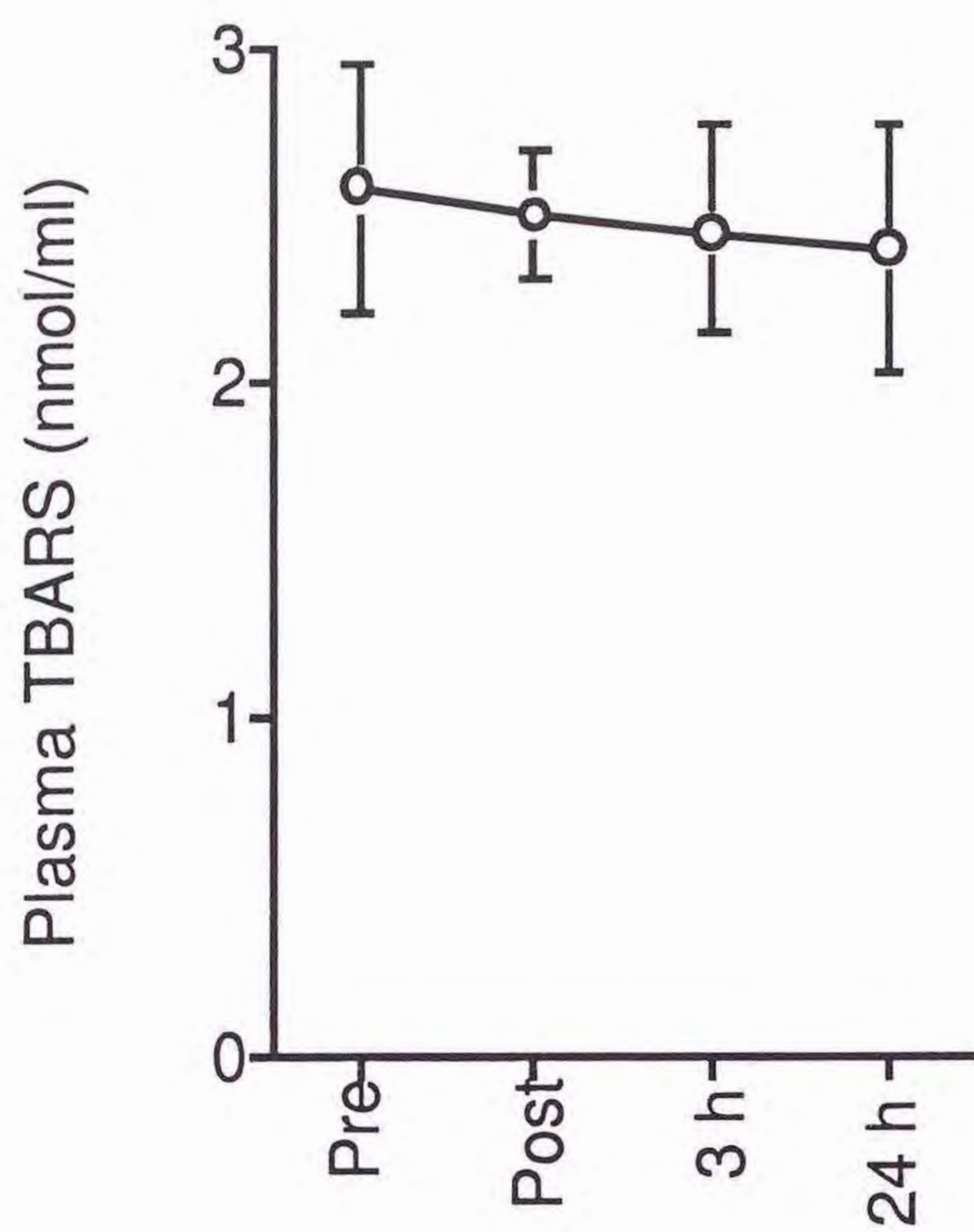


Fig. 1-1-3 Plasma TBARS and LPO in trained subjects. Means \pm SD for 5 subjects.

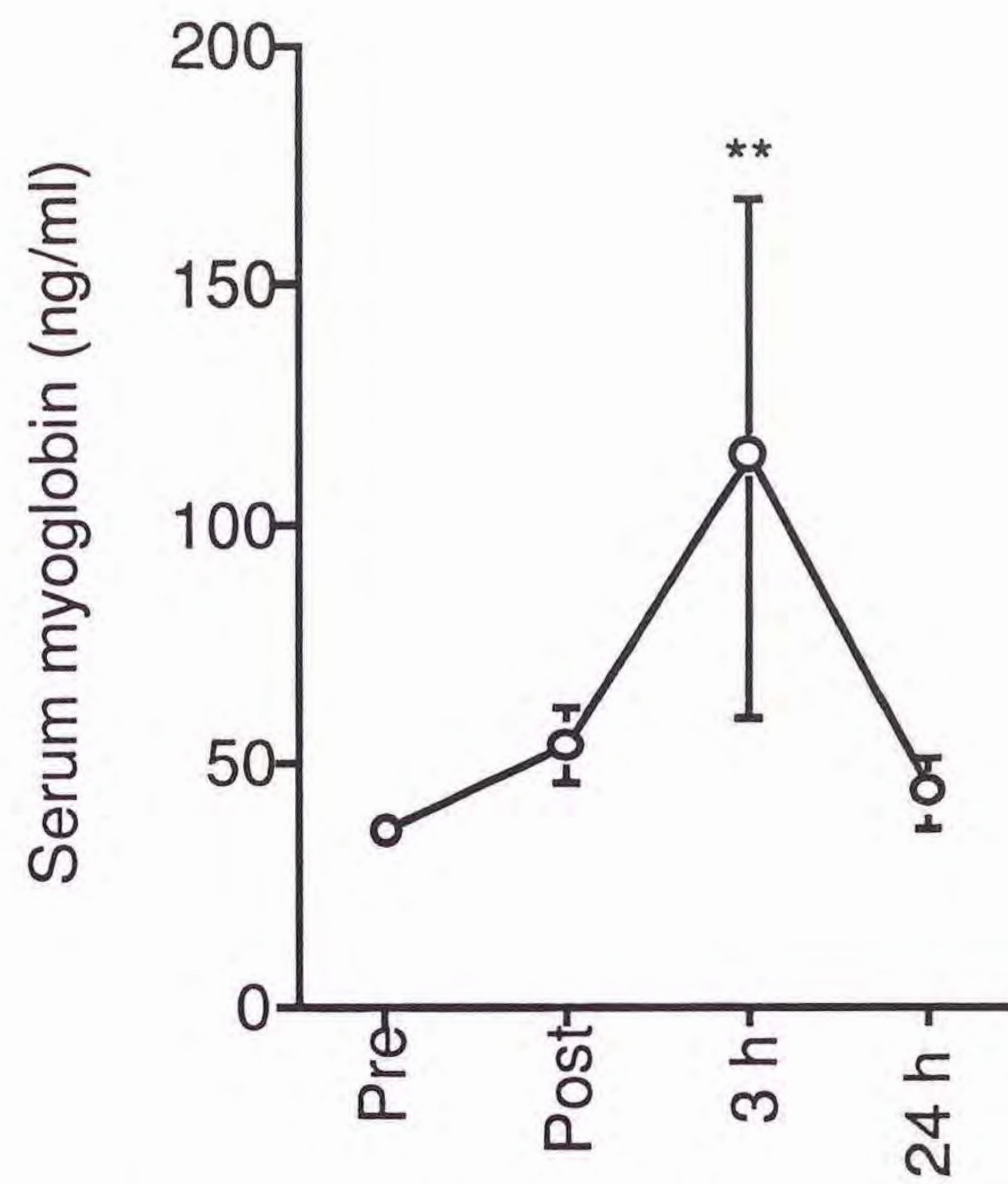
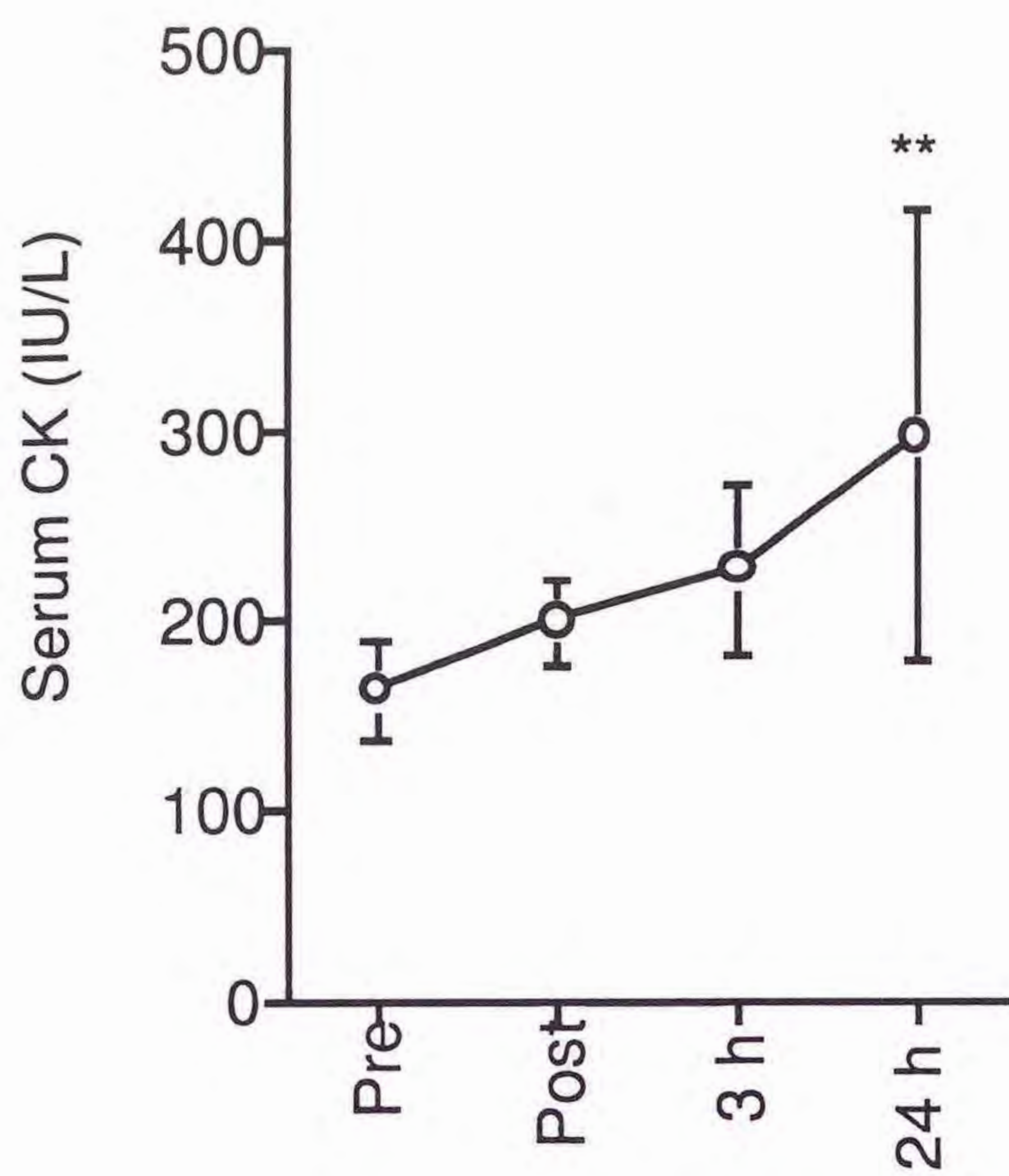


Fig 1-1-4 Serum CK and myoglobin in trained subjects. Means \pm SD for 5 subjects. * * $P < 0.01$ vs pre.

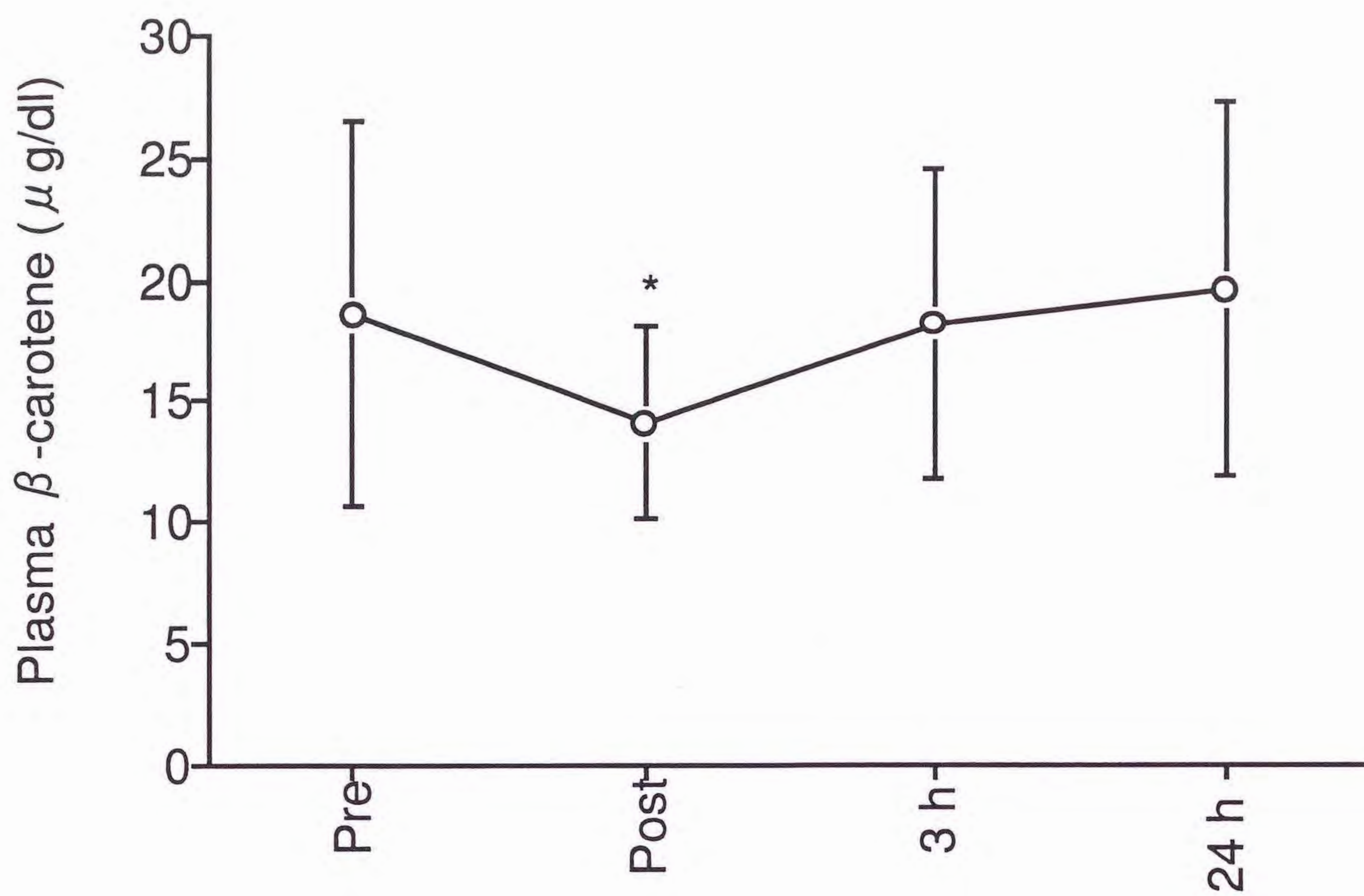


Fig. 1-1-5 Plasma β -carotene in trained subjects. Means \pm SD for 5 subjects. * $P < 0.05$ vs Pre.

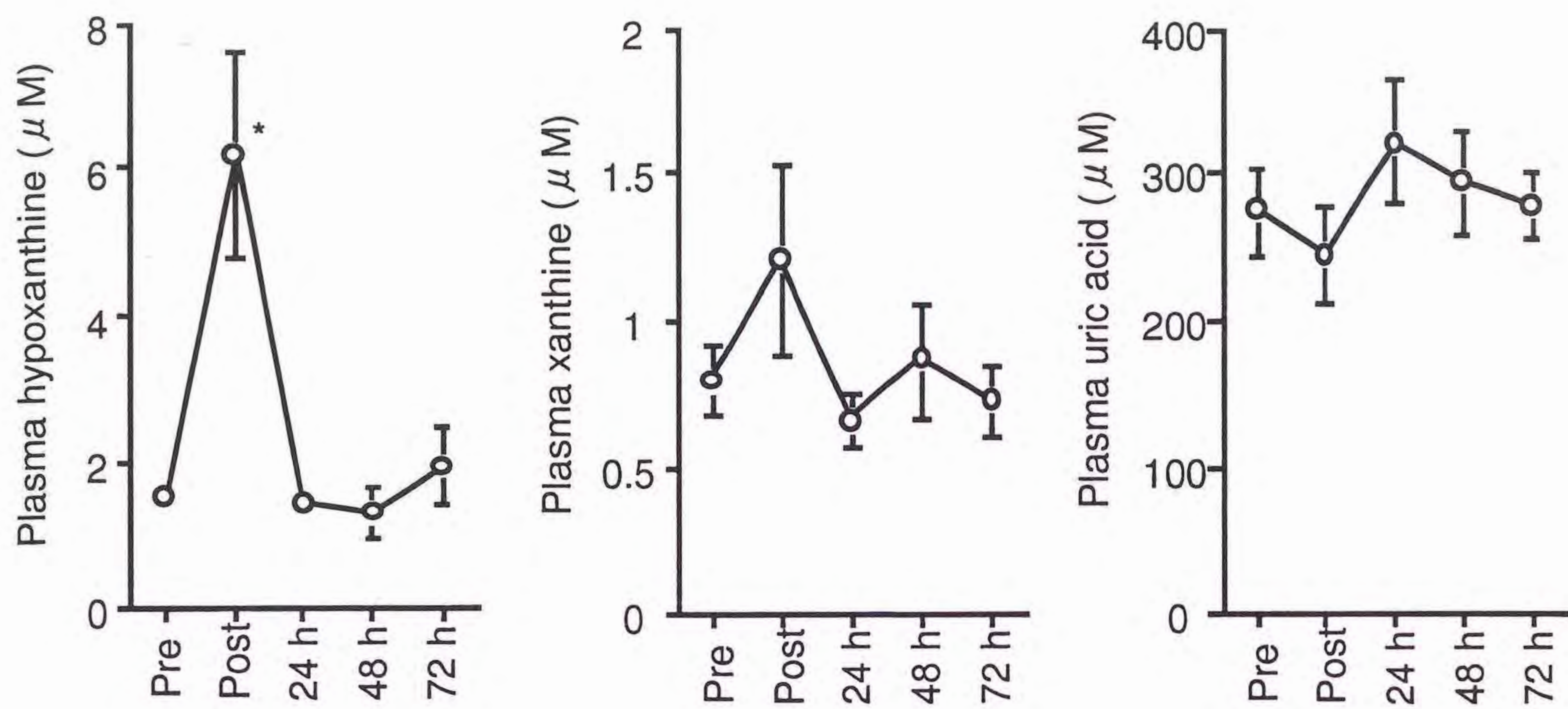


Fig. 1-1-6 Plasma hypoxanthine, xanthine and uric acid. in untrained subjects. Means \pm SD for 7 subjects. ** $P < 0.05$ vs Pre

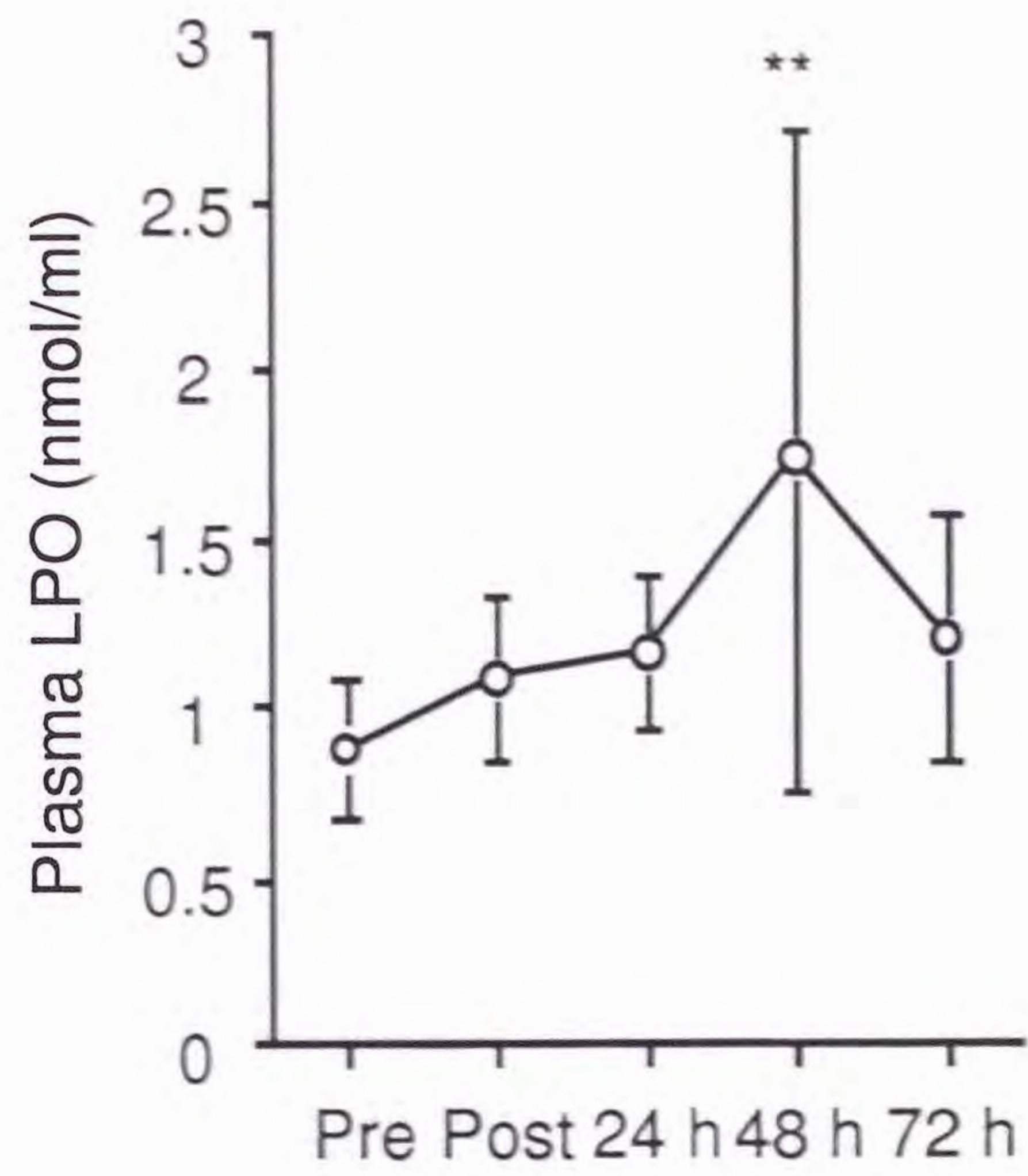
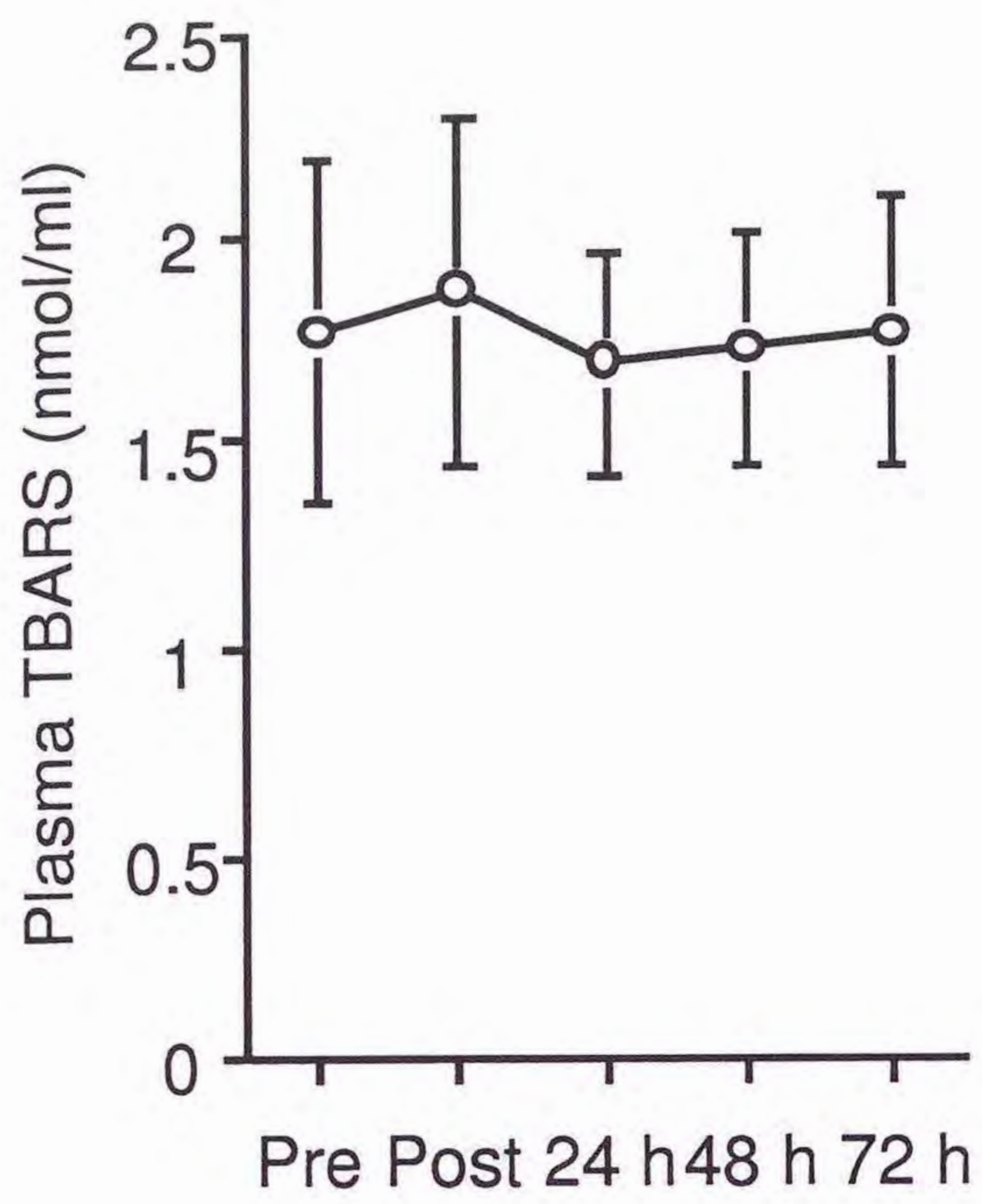


Fig. 1-1-7 Plasma TBARS and LPO in untrained subjects. Means \pm SD for 7 subjects. ** $P < 0.01$ vs Pre

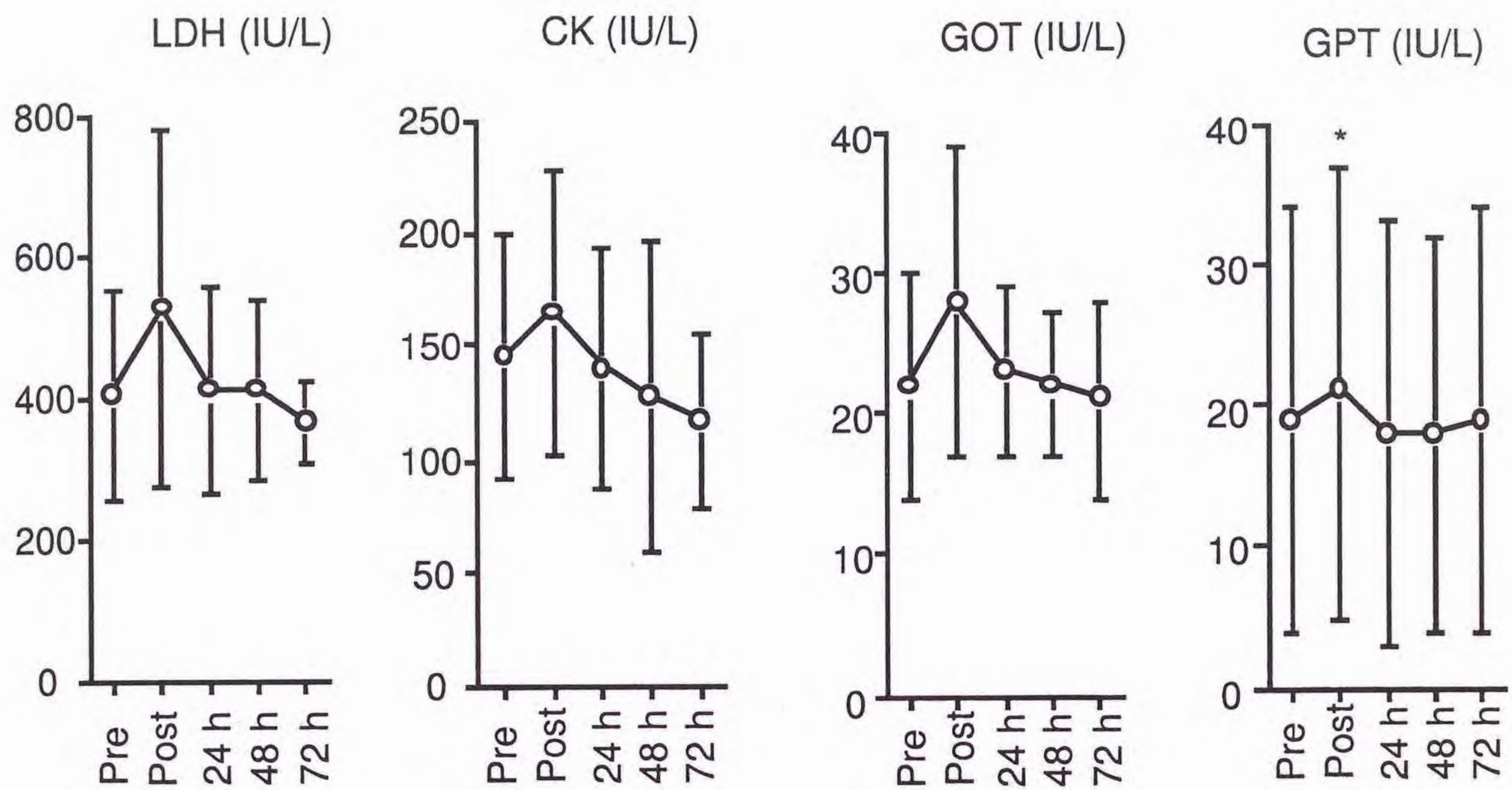


Fig. 1-1-8 Serum LDH, CK, GOT, and GPT in untrained subjects. Means \pm SD for 7 subjects. ** $P < 0.05$ vs Pre

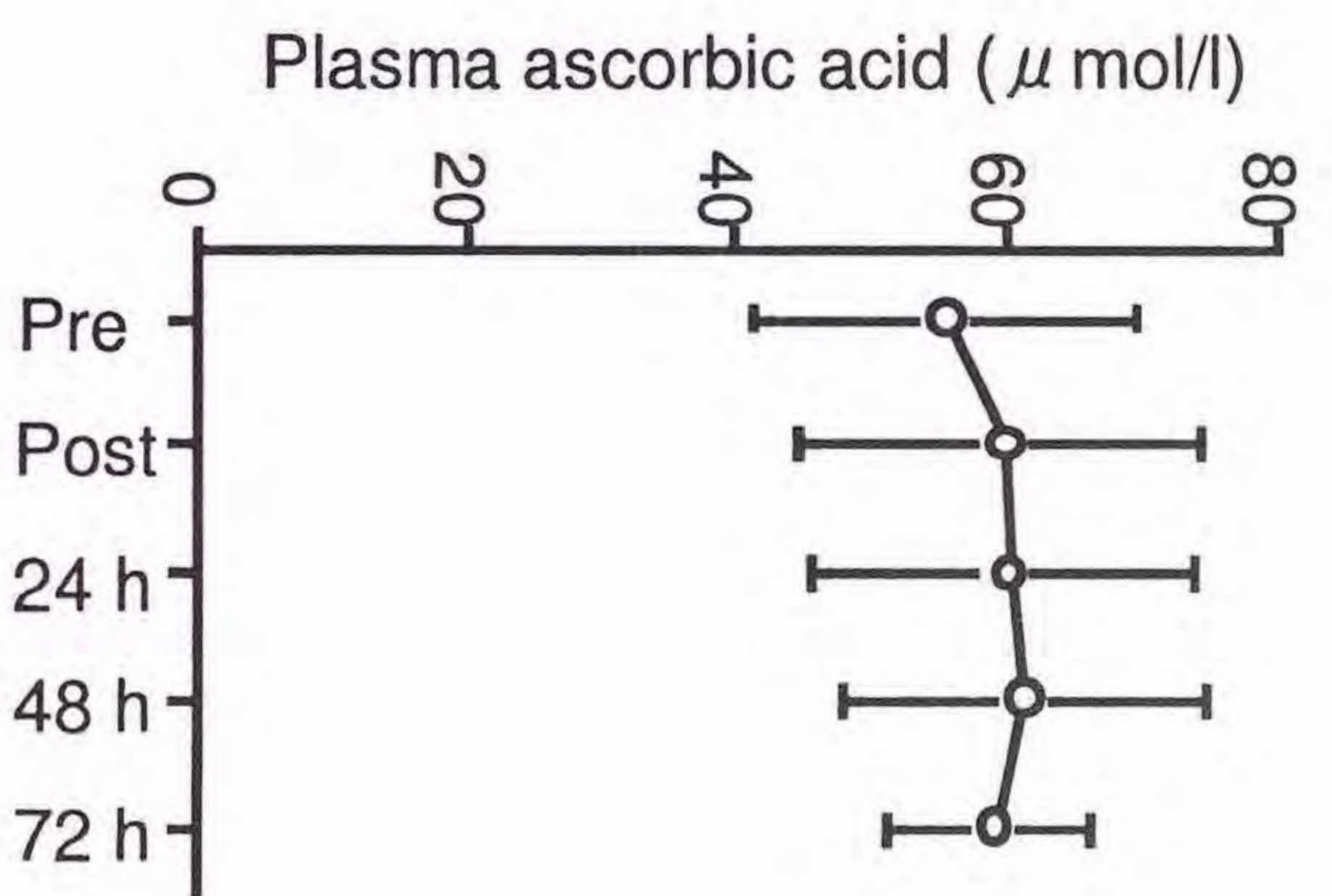
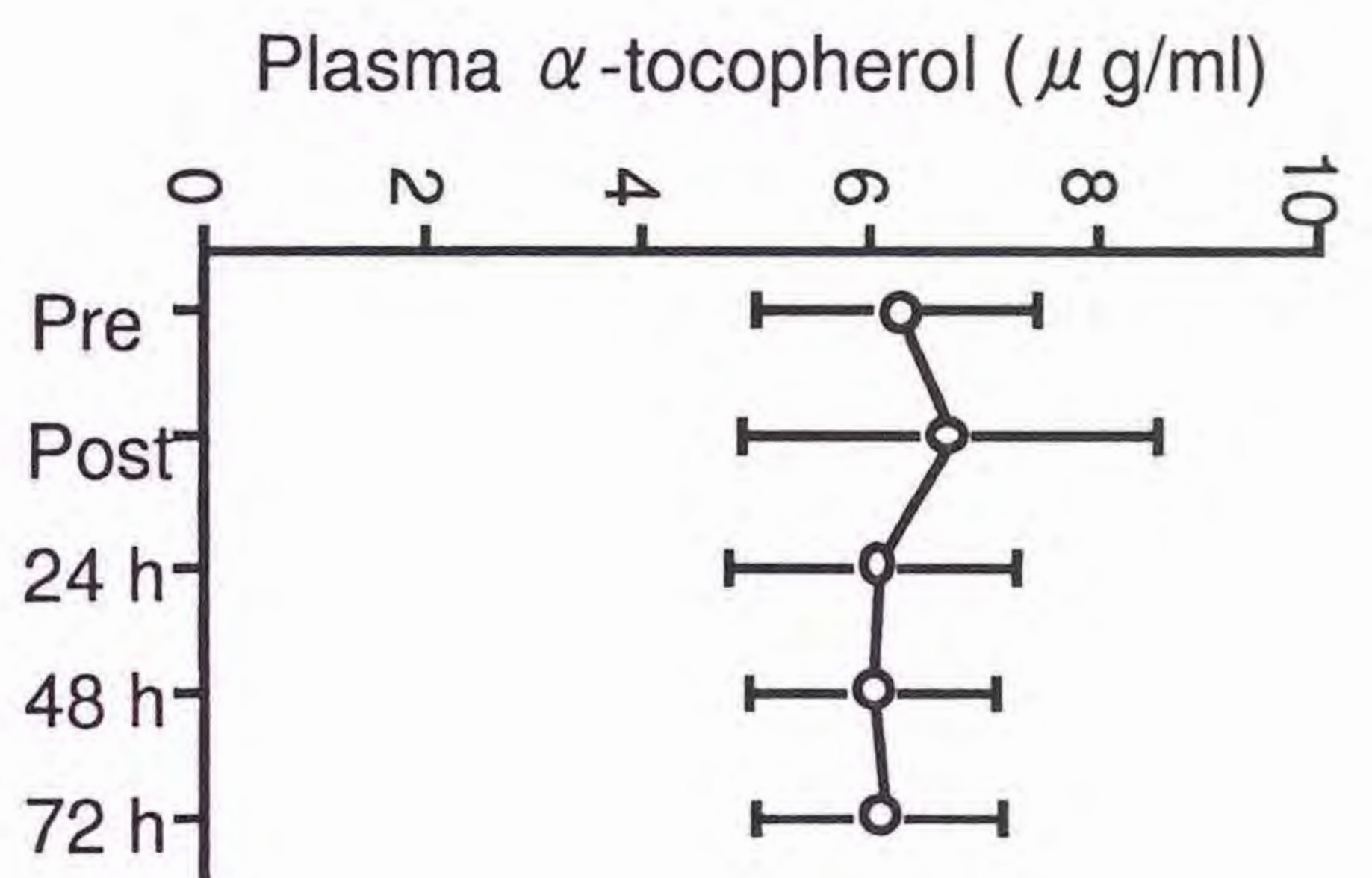
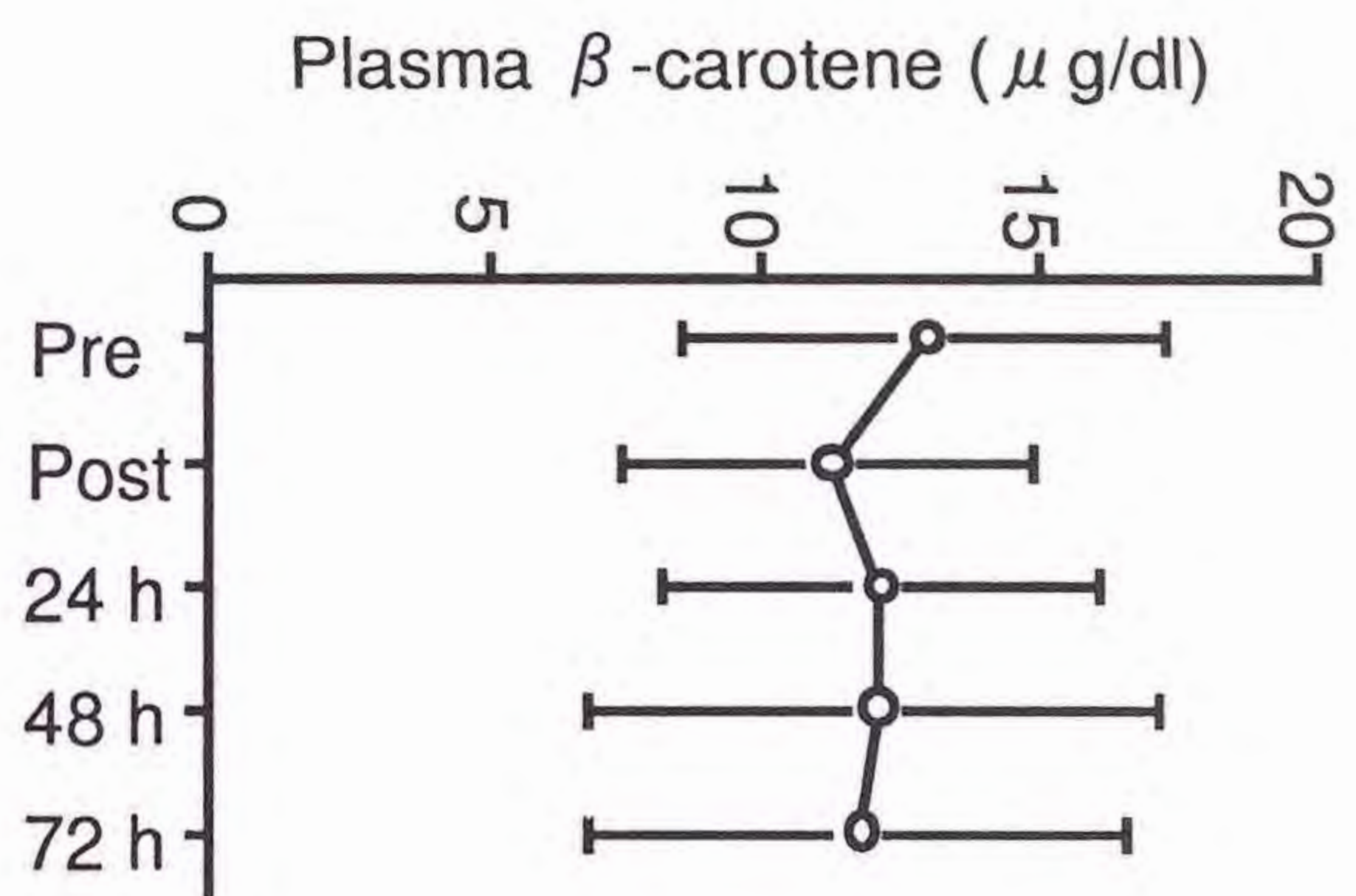


Fig. 1-1-9 Plasma β -caroten, α -tocopherol, and ascorbic acid in untrained subjects.
Means \pm SD for 7 subjects.

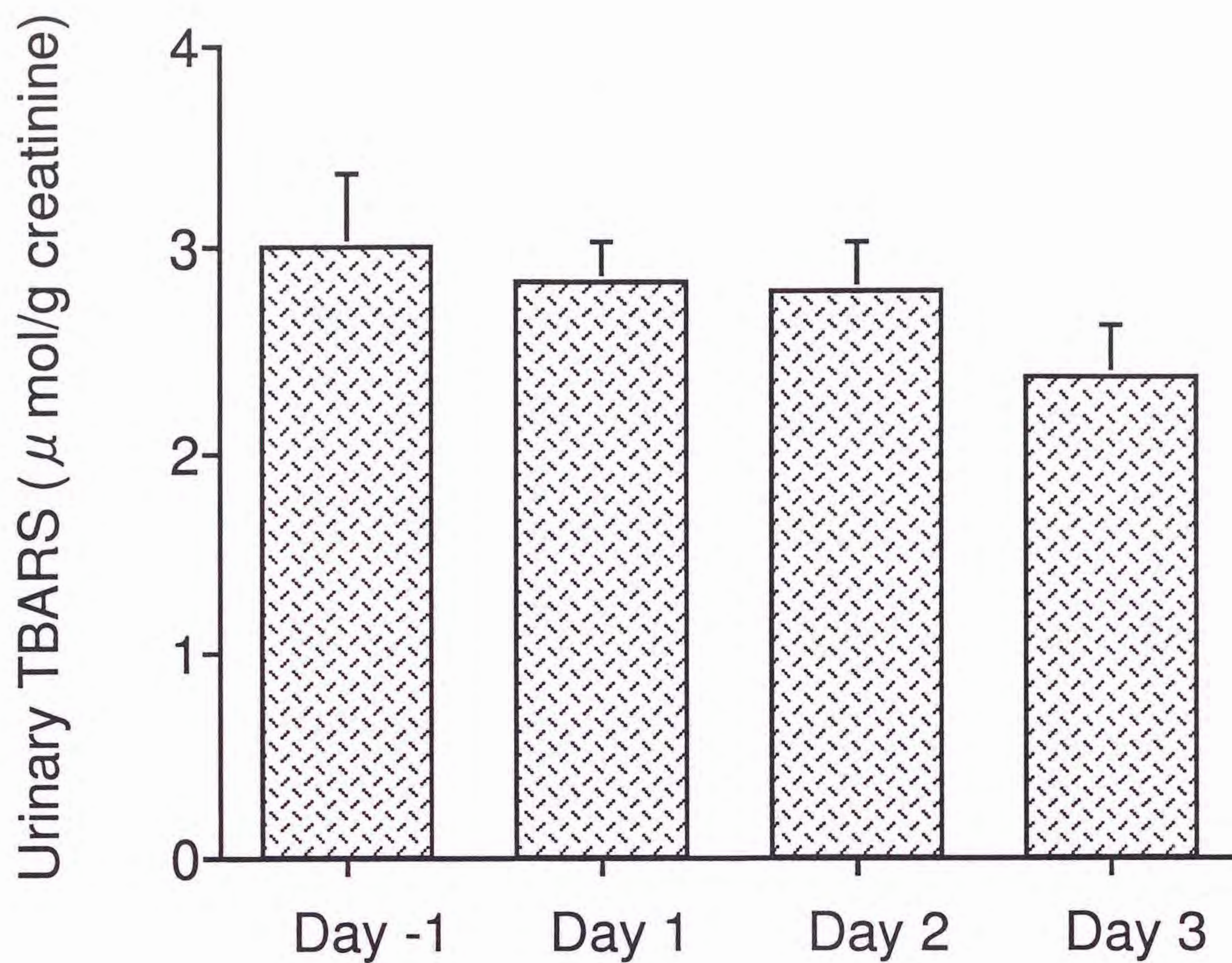


Fig. 1-1-10 Urinary TBARS excretion in untrained subjects. Means \pm SD for 7 subjects.

時間は 25.4 ± 1.2 分だった。

血漿ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸濃度 (Fig. 1-1-2)

血漿ヒポキサンチン、キサンチンは運動直後に最も上昇したが、24 時間後には低下した。血漿尿酸は運動前値にくらべて運動直後に有意に上昇し、3 時間後にさらに上昇した後、24 時間後には低下した。

血漿 TBARS 及び LPO 濃度 (Fig. 1-1-3)

血漿 TBARS 及び LPO とともに運動による有意な変化は認められなかった。

血漿 CK およびミオグロビン濃度 (Fig. 1-1-4)

血漿 CK は運動後、徐々に増加する傾向が認められ、24 時間後には運動前値にくらべて有意な高値を示した。血漿ミオグロビンは運動直後に上昇傾向にあり、3 時間後には有意に上昇した後、24 時間後には低下した。

血漿 β -カロテン濃度 (Fig. 1-1-5)

血漿 β -カロテン濃度は、運動直後で運動前にくらべて有意に低下した。3 時間後および 24 時間後では運動前値とに有意差はなかった。

研究 2

運動時間および最大心拍数

運動負荷実験中の最大心拍数は 183.0 ± 5.0 bpm だった。疲労困憊に至るまでの時間は 28.5 ± 1.8 分だった。

血漿ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸濃度 (Fig. 1-1-6)

血漿ヒポキサンチンは運動直後で運動前に比較して有意に上昇した。キサンチンも運動直後で上昇傾向を示したが、有意ではなかった。血漿尿酸は運動直後に低下する傾向が認められ、24 時間後には運動前値よりも高い傾向にあったが、いずれの時点でも有意な変化は認められなかった。

血漿 TBARS 及び LPO 濃度 (Fig. 1-1-7)

血漿 TBARS は、有意ではないが運動直後にやや上昇した以外には変化は認められなかった。血漿 LPO は運動後上昇傾向を示し、48 時間後では運動前値にくらべて有意な上昇が認められた。

血清 LDH、CK、GOT および GPT 濃度 (Fig. 1-1-8)

血清 LDH、CK、GOT は有意ではないが運動直後に上昇した後、低下した。血清 GPT は運動直後に有意に上昇した後、低下した。

血漿 β -カロテン、 α -トコフェロール、アスコルビン酸濃度 (Fig. 1-1-9)

すべてで有意な変化は認められなかったが、 β -カロテン濃度が運動直後に低下する傾向を示したのに対して、 α -トコフェロールおよびアスコルビン酸は上昇する傾向が認められた。

尿中 TBARS 排泄 (Fig. 1-1-10)

尿中 TBARS 排泄は、運動 3 日目が運動前日にくらべてやや少なかったが、有意な変化は認められなかった。

考察

血中尿酸濃度は運動によって上昇することが知られている^{34, 62, 63 64, 65, 66)}。その上昇程度は運動強度に比例しており、強い運動によってより上昇する^{63, 66)}。本実験においても、運動後に尿酸濃度は鍛練者と非鍛練者の両方で上昇した。尿酸およびキサンチンはキサンチン・オキシダーゼによる酵素反応で生成し、この過程でスーパーオキシド ($O_2^{\cdot -}$) が発生する。したがって、本研究で用いた 30 分程度で一過性に疲労困憊に至る運動では、活性酸素の生成が増加したことが示唆された。

血漿尿酸およびキサンチン濃度の運動後の変化に、鍛練者と非鍛練者で違いが認められたことは興味深い。すなわち、鍛練者では運動後に尿酸、キサンチンともに上昇したのに対して、非鍛練者では尿酸は運動直後に低下傾向を示した後、上昇し、

キサンチンの上昇は軽度であった。このことは、非鍛練者での運動負荷の絶対量が鍛練者に比べて低かったために代謝された ATP が少なく、その結果、尿酸およびキサンチンの生成量が低かったことを反映したものと推測される。

血中尿酸濃度の変動からは、運動によって活性酸素の生成が増加したことが示唆されたが、酸化ストレスの指標とされている血漿 TBARS および LPO は上昇しなかった。運動による活性酸素の生成は運動強度や時間によって異なることが報告されている⁶⁷⁾。すなわち、血漿 TBARS 濃度は運動強度が高いときにより上昇する^{7, 68, 37)}。運動時間については、短時間の高強度の運動では上昇するとするものが多いが⁶⁷⁾、持続的な長時間の運動では上昇するという報告⁶⁹⁾がある反面、変化しない^{62, 70, 64)}、あるいは低下する³⁴⁾という報告もある。組織中の TBARS は、運動によって、筋肉^{10, 26, 29, 68, 71)}、肝臓^{7, 10, 26)}で増加するという報告がある。トレーニングが運動による TBARS の変化に影響すること知られている。すなわち、トレーニングによって運動による血中 TBARS 濃度の上昇が抑制されたり^{62, 72)}、筋肉^{29, 68)}および肝臓^{26, 29)}の TBARS の上昇が低減される。これにはトレーニングによって活性酸素種を消去する酵素系を高める^{26, 27, 28, 29, 30, 31, 32)}ことが関与していると考えられている。本研究では血漿 TBARS の運動による変化は有意ではなかったものの、非鍛練者では運動後にやや上昇傾向にあったのに対して、鍛練者ではむしろ低下傾向にあった。これは、非鍛練者と鍛練者とで運動強度が異なっていたものの、鍛練者ではトレーニングによって運動による TBARS の上昇が抑制されたことを示しているものかもしれない。

組織傷害の指標である血中逸脱酵素の濃度が運動後に上昇することはよく知られているが、今回の一過性に疲労困憊に至る運動でも上昇したことから、組織傷害が起きていたことが認められた。本実験よりもやや運動時間が長いものの、45 分間の下り坂を走行する運動後に、血中 CK、LDH、GOT レベルが上昇することが報告されている²³⁾。また、5~10 マイル走行の後で、CK および LDH が上昇することが認められている⁷²⁾。

血漿 α -トコフェロールおよびアスコルビン酸は、運動後に上昇傾向を示し、これまでの報告と一致した^{34, 39, 62, 73, 74, 75, 76, 77)}。これらの抗酸化ビタミン濃度が運動に

よって上昇するのは、必要とされる部位への貯蔵部位からの動員が起こっているものと考えられる^{64, 75, 76, 78)}。ラットの骨格筋では、40 分間のトレッドミル走によって α -トコフェロール含量が約30%低下することから、運動時には骨格筋で α -トコフェロールの消費が亢進しているものと考えられる⁷⁹⁾。鍛練者では非鍛練者よりも、赤血球中の α -トコフェロール含量およびリンパ球中のアスコルビン酸含量が高い⁸⁰⁾。また、ランナーの血清アスコルビン酸濃度が対照よりも高く、ランナーの血清アスコルビン酸濃度は一日あたりの走行距離が長い方が高い⁷⁸⁾。これらのことは、運動による酸化ストレスの増加に対する適応反応と推測される。本研究では、血漿 β -カロテン濃度を鍛練者と非鍛練者とで測定したが、トレーニングによる差はみられなかった。

血中尿酸濃度も運動によって上昇するが^{34, 62, 63, 64, 65, 66)}、これが抗酸化能を有することを考えあわせると、運動後に抗酸化能を高めるような生体応答が存在することが推測される。事実、血清の総抗酸化能は運動によって上昇することが報告されており^{64, 74, 81, 82)}、尿酸⁶⁴⁾や α -トコフェロール⁸²⁾の上昇が貢献しているとされている。しかし、尿酸が生体内で果たす抗酸化能についてはよくわかっていない。

本研究で測定した血中抗酸化物質のうち、 β -カロテンだけが運動直後に低下する傾向を示した。血中 β -カロテン濃度は、30 秒間のジャンプを6セットおこなった運動⁷³⁾、およびマラソン³⁴⁾によって変化しなかったと報告されている。運動によって、血中アスコルビン酸や α -トコフェロール濃度が上昇するのは、貯蔵部位、すなわちアスコルビン酸では副腎など⁷⁶⁾、 α -トコフェロールでは肝臓や脂肪組織などからの動員が亢進するため^{64, 75)}と推測されている。 β -カロテンは、肝臓や副腎に高濃度に存在しており^{83, 84, 85)}、運動時に血中濃度が上昇した、アスコルビン酸や α -トコフェロールと存在部位が共通している。 β -カロテンだけが運動時に低下した理由としては、運動時に代謝が亢進した筋肉における β -カロテンの要求が亢進したために、血中からの移行が増加した可能性が考えられるが、詳細は不明である。

要約

漸増負荷で一過性に疲労困憊に至る運動が、酸化ストレスの指標および抗酸化ビタミンに及ぼす影響を検討した。運動時の酸化ストレスに対する抗酸化能はトレーニングされているか否かが影響するので、本研究では鍛練者と非鍛練者において検討した。

いずれの対象者においても運動後に血漿キサンチン・尿酸濃度が上昇したことから、キサンチンオキシダーゼ系による活性酸素の生成が増加したことが推測された。しかし、酸化ストレスの指標の血漿 TBARS および LPO 濃度は運動によって上昇しなかった。

組織損傷を示す血中逸脱物が運動後に上昇したことから、30 分前後で一過性に疲労困憊に至る運動において、組織損傷が起きたことが認められた。

血漿 β -カロテンは運動直後に低下する傾向を示した。しかし、 α -トコフェロール、アスコルビン酸、尿酸の血漿濃度が運動後に上昇したことは、抗酸化能を高めるような生体応答が起きたことを示唆している。

第2節 20 km ランニング

第1節よりも運動時間が長く、酸素消費量が多いために酸化伤的傷害が多いと考えられる20 km ランニングにおいて、酸化ストレスの指標および抗酸化ビタミンの変化を検討した。

研究方法 (Fig. 1-2-1)

対象；大学陸上競技部の長距離選手11名を対象にした。対象者は、年齢 19.1 ± 0.2 才、身長 170.6 ± 1.1 cm、体重 59.3 ± 1.6 kg、最大酸素摂取量は 57.5 ± 1.9 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷および採血、採尿方法；運動は20 kmのタイムトライアルとした。タイムトライアルの4週間前に、自転車エルゴメーターによる運動負荷試験をおこない、酸素摂取量と心拍数を測定し、最大酸素摂取量および最大心拍数を求めた。このときの値を20 km ランニング中の酸素摂取量の計算に用いた。採血を運動直前、運動直後、24時間後、48時間後及び72時間後におこなった。採尿は、運動前の3日間と運動後の3日間の全尿を採取した。また、対象者には運動中の心拍数を記録するために Heart rate monitor (Polar Vantage XL、キャノン、東京) を装着させた。運動中の平均心拍数は Heart rate analysis software Ver 3.00a によって求めた。

測定項目；血漿 TBARS (TBA 法、過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株)、CK (CPK-II テストワコー、和光純薬工業株)、GOT (GOT-UV テストワコー、和光純薬工業株)、GPT (GPT-UV テストワコー、和光純薬工業株)、尿酸 (HPLC 法)、 α -トコフェロール (HPLC 法)⁵⁰⁾ の濃度を測定した。また、尿中 TBARS 濃度 (TBA 法、過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株) を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。P<0.05 を有意とした。

研究結果

運動負荷

20 km のランニング時間は 79.21 ± 2.39 分、平均走行速度は 254.7 ± 7.5 m/分、平均心拍数は 170.9 ± 1.9 拍/分だった。ランニング中の体重当たりの総酸素摂取量は 4.04 ± 0.13 l/kg と算出された。

血漿尿酸濃度 (Fig. 1-2-2)

運動直後に運動前にくらべて有意に上昇したが、その後は有意な差を認めなかった。

血漿 TBARS 濃度 (Fig. 1-2-3)

運動前にくらべて、直後および 24 時間後に有意な低値を示した。

尿中 TBARS 排泄量 (Fig. 1-2-4)

尿中 TBARS 排泄は、運動の 2 日後および 3 日後にやや増加したが、有意な変化は認められなかった。

血漿 CK、GOT および GPT (Fig. 1-2-5)

いずれの酵素も運動前値にくらべて運動後に有意に上昇した。CK では 48 時間後まで、GOT と GPT では 72 時間後においても有意な高値にあった。

血漿 α -トコフェロール濃度 (Fig. 1-2-6)

運動前値にくらべ運動直後、24、48、72 時間後のいずれの時点においても有意に上昇していた。

考察

20 km ランニング後に血漿尿酸濃度が上昇したことは、キサンチン・オキシダーゼによる活性酸素の生成が運動によって増加していたことを示唆する。本研究と同等の運動における血中尿酸に関する報告では、ハーフマラソン (約 20 km) で運動前 $300 \mu\text{M}$ から運動後 $370 \mu\text{M}$ に上昇している⁶²⁾。この変化は本研究で

Subjects, eleven long distance runners
Exercise, 20 km running

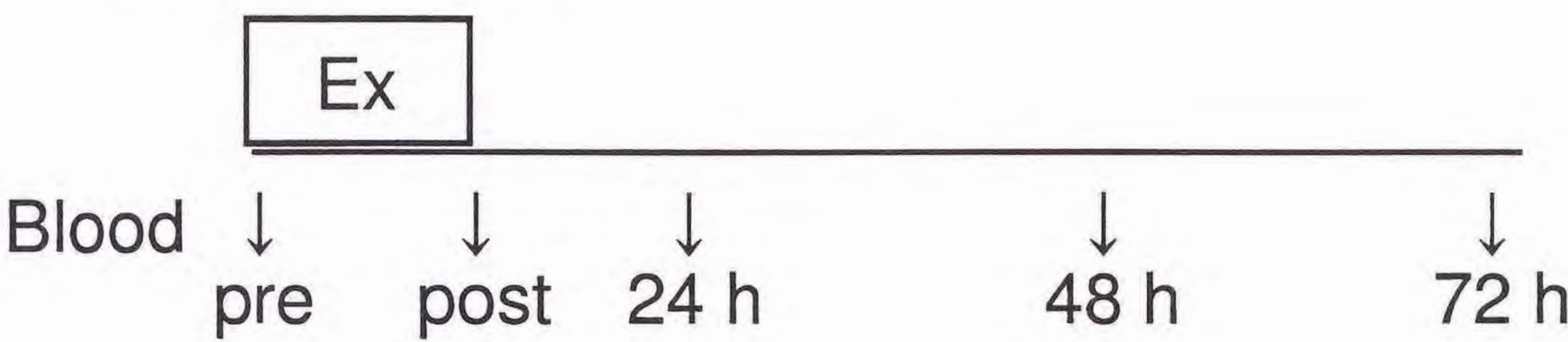


Fig. 1-2-1 Outline of the protocol

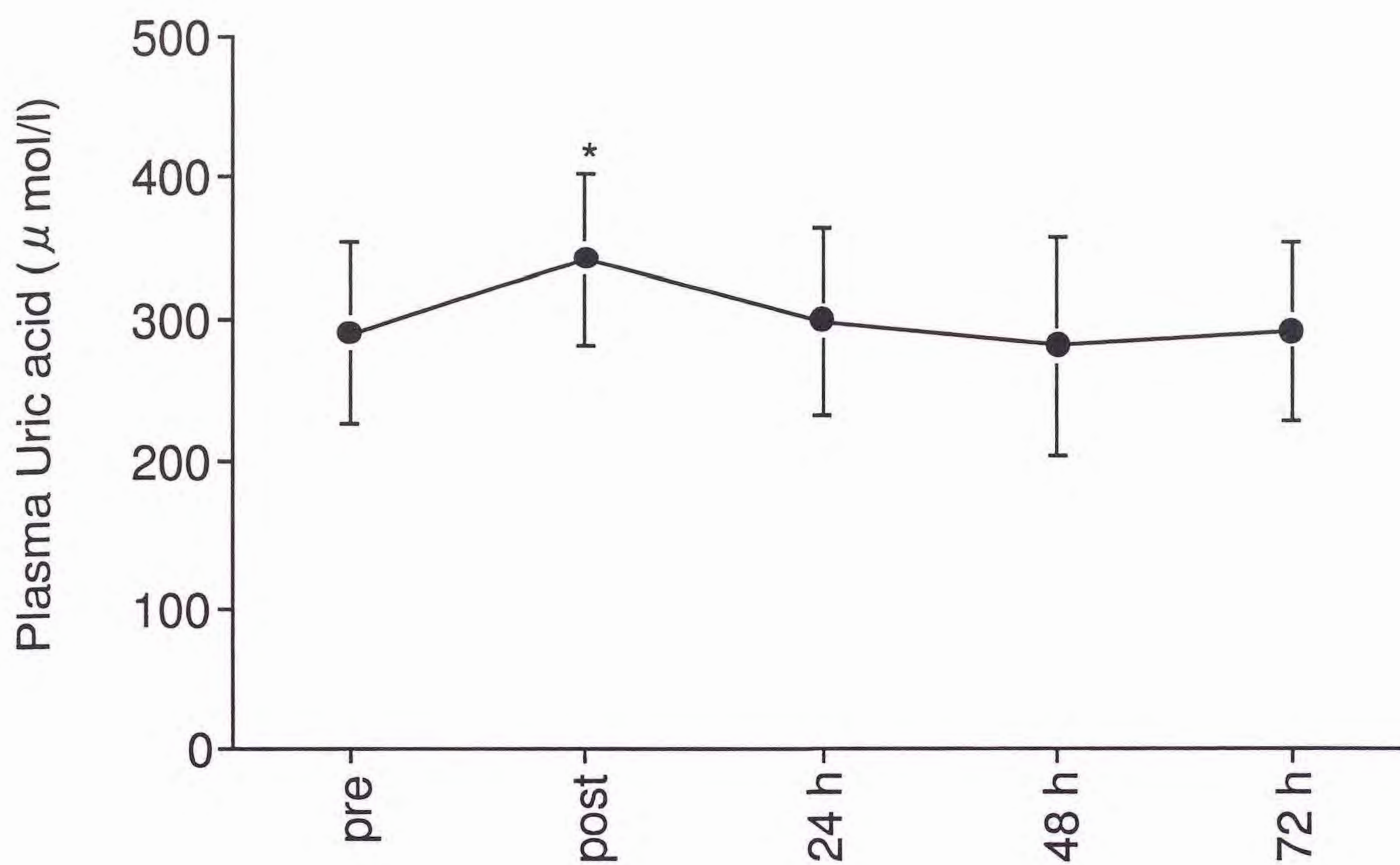


Fig. 1-2-2 Plasma uric acid. Means \pm SD for 11 subjects.
* $P < 0.05$ vs Pre.

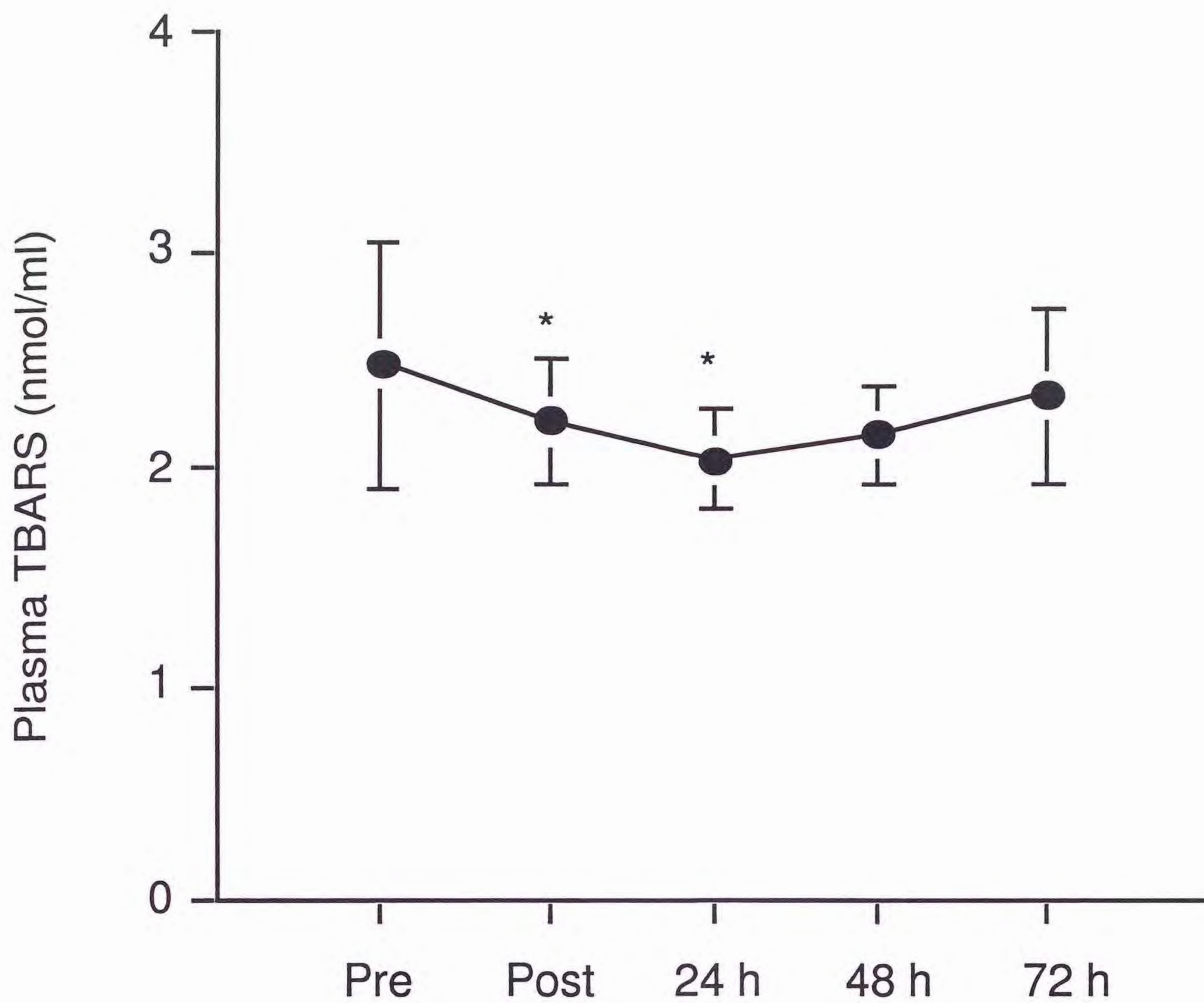


Fig. 1-2-3 Plasma TBARS. Means \pm SD for 11 subjects.
* $P < 0.05$ vs Pre.

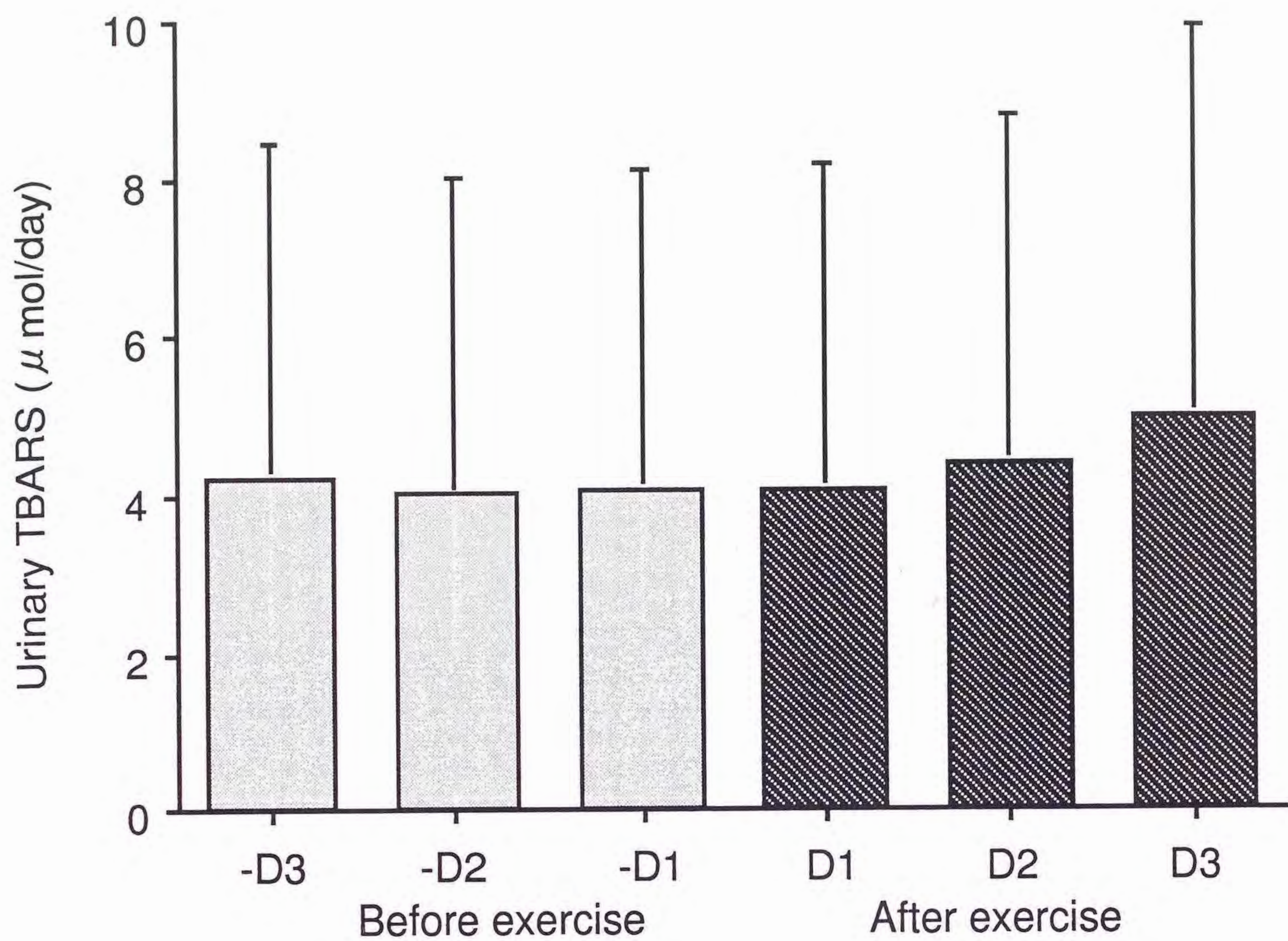


Fig. 1-2-4 Urinary TBARS excretion before and after exercise.
Means \pm SD for 11 subjects.

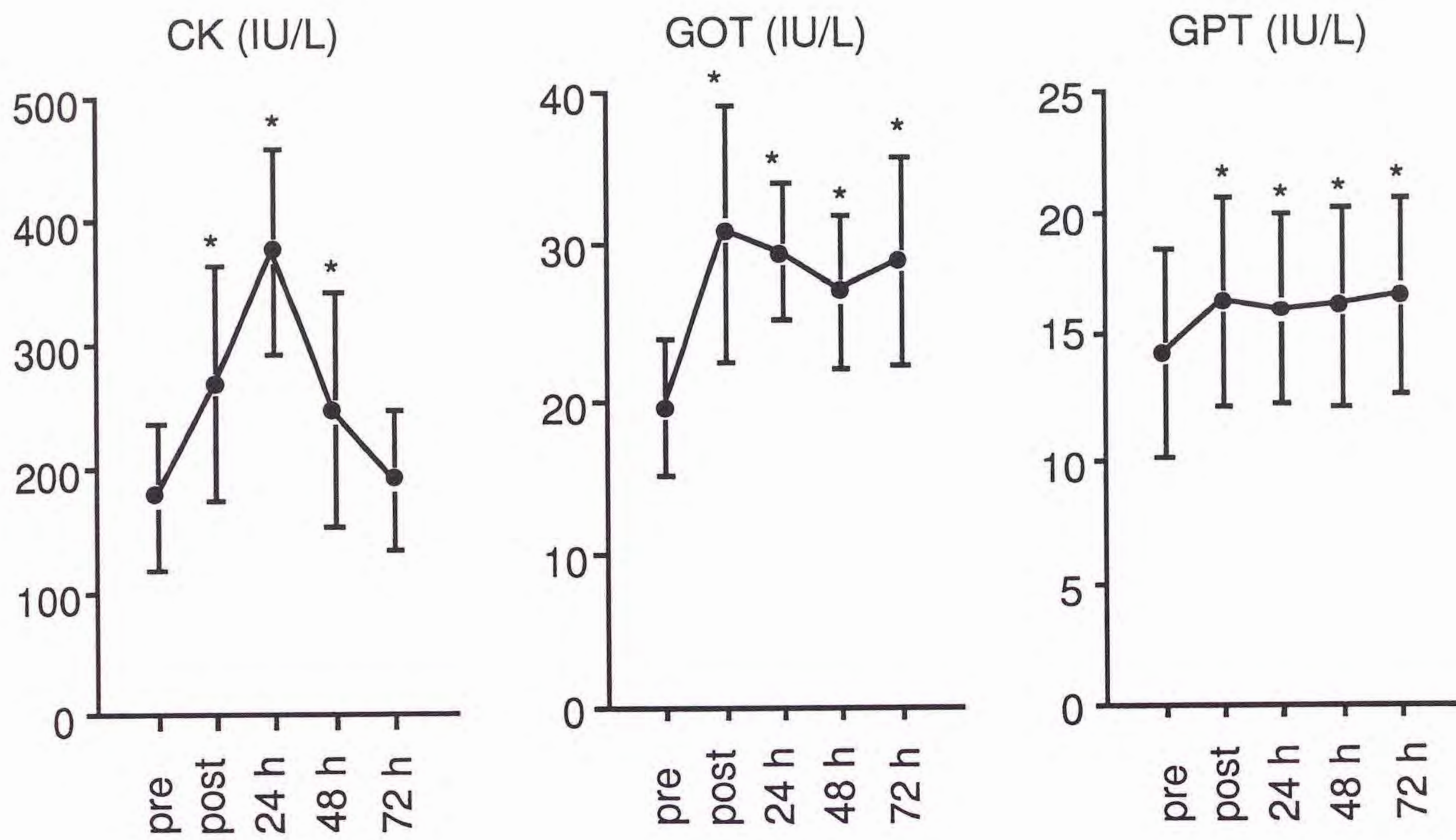


Fig. 1-2-5 Plasma CK, GOT, and GPT. Means \pm SD for 11 subjects.
 * $P < 0.01$ vs Pre.

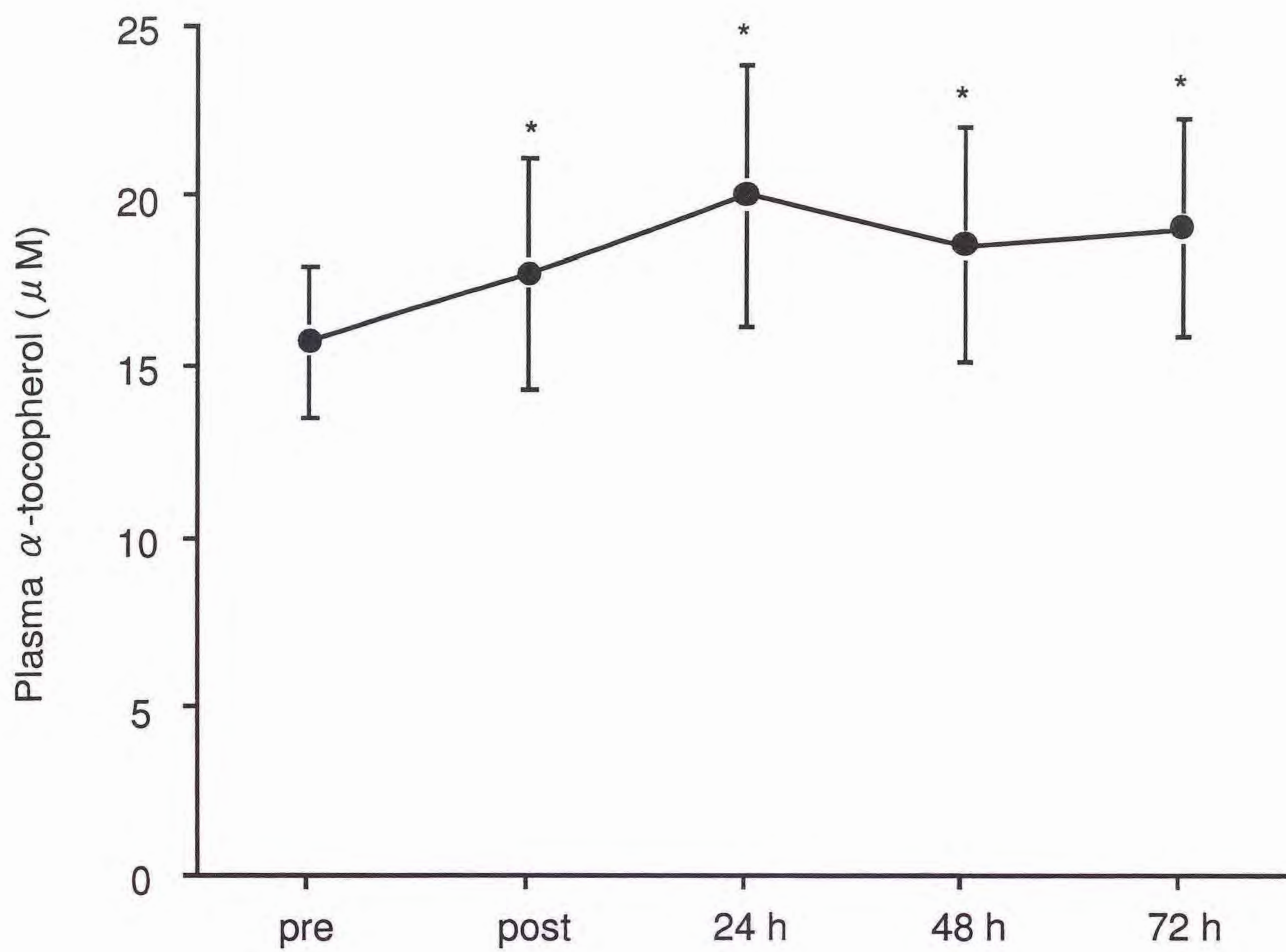


Fig. 1-2-6 Plasma α -tocopherol. Means \pm SD for 11 subjects.
* $P < 0.05$ vs Pre.

の変化とほぼ同じである。ハーフマラソンの倍の距離を走るマラソンでは運動前 $300 \mu\text{M}$ からおよそ $400 \mu\text{M}$ に上昇したことが示されている³⁴⁾。

しかし、活性酸素傷害の指標として測定した血漿 TBARS 濃度は、運動直後に有意に低下した。持久的な運動による血中 TBARS 濃度の変化については、ハーフマラソン⁶²⁾ や 2 時間半で約 20 km を走行した場合⁷⁰⁾ に上昇しなかったことが報告されている。また、血中 TBARS は運動強度に依存して上昇すること^{68, 37)}、70% VO_2max の運動では上昇しないことが示されている^{7, 86)}。さらに、マラソンにおいては血中 TBARS 濃度が運動後に低下したとの報告があり³⁴⁾、本研究結果と一致する。しかし、80 km のウルトラマラソンでは上昇したことも報告されている⁶⁹⁾。このように、持久運動では血中尿酸濃度が上昇して活性酸素の増加が示唆される場合にも、血中 TBARS 濃度は必ずしも上昇しないものと考えられる。

TBARS は尿中に排泄されたり⁸⁷⁾、生体内で酸化され呼気中に排泄されることが報告されている⁸⁸⁾。尿中 TBARS 排泄は 45 分間のランニングの 12 日後に増加したことが報告されている⁸⁹⁾。したがって、本研究で観察された運動後の血漿 TBARS 濃度の低下は、尿中への排泄が増加したことによる可能性が考えられた。本研究では尿中 TBARS 排泄は、運動の 2 日後および 3 日後に有意ではなかったが、増加する傾向にあった。しかし、血漿 TBARS 濃度は運動の 48 時間後以降では運動前値と差がなく、本研究では血漿 TBARS 濃度の低下には尿中排泄の増加は関与していなかったと推測される。

組織損傷の指標である血漿 CK、GOT および GPT は、本研究において運動後に上昇した。運動前値にくらべて、CK では運動の 48 時間後まで、GOT および GPT では 72 時間後まで有意な高値にあった。血漿 CK レベルが運動直後よりも 24 時間後でより高値を示したことは、先行研究と一致する^{23, 34, 62)}。

一方、血漿 GOT、GPT が運動の 3 日後まで上昇したことは、運動によって骨格筋だけでなく肝臓も傷害されたことを示唆している。しかし、マラソンでは GOT、GPT は上昇しなかったとの報告もある³⁴⁾。約 30kg を背負った 24 時間の歩行で GOT が上昇し、40 時間後まで高値だったこと⁹⁰⁾、30~40 kg の装備を携行した 80 km の行軍において、行軍の 8 日後まで GOT、GPT が上昇していたことが報告されてい

る⁹¹⁾。このとき CK は行軍の前値にもどっていたことから、肝臓などの傷害は筋肉よりも長時間つづくと考えられている⁹¹⁾。本研究においても CK が運動前値にもどった運動の 72 時間後に GOT、GPT が依然として高値にあり、これらの結果と一致していた。

血漿 α -トコフェロール濃度が運動後に上昇したことは、第 1 節でのより短時間の運動時と同様の変化で、運動で増加する活性酸素に対処するための生体応答が、20 km ランニングという運動でも起きたものと考えられる。血漿 α -トコフェロールは 31 km ランニングで上昇したと報告されている^{74, 82)}。マラソンでは上昇したとする報告⁸²⁾と、変化しなかったという報告がある³⁴⁾。また、赤血球の α -トコフェロール濃度がハーフマラソンの 48 時間後まで上昇していたとの報告がある⁶²⁾。本研究での血漿 α -トコフェロール濃度の上昇は、運動の 72 時間後まで持続した。血漿の総抗酸化能が運動によって上昇し^{64, 74, 81)}、その上昇と血漿 α -トコフェロール濃度とに相関があったことが報告されていることから⁸²⁾、本研究の運動後は 72 時間後まで血漿の抗酸化能が上昇していたと推測される。

要約

第 1 節での漸増負荷運動よりも運動時間が長く、酸素消費量が多いために酸化的傷害が多いと考えられる 20 km ランニングで、酸化ストレスの指標および抗酸化ビタミンの変化を検討した。

運動後に血漿キサンチンおよび尿酸濃度が上昇していたことから、20 km ランニングでもキサンチン・オキシダーゼ系が亢進し、活性酸素種の生成が増加していたことが推測された。しかし、血漿 TBARS 濃度が運動後に低下した。尿中 TBARS 排泄には運動後に有意な変化がなく、血漿 TBARS 濃度の低下との関係は明らかではなかった。

血漿逸脱酵素が運動後に上昇したことから 20 km ランニングで組織損傷が起きたことが認められた。血漿 GOT、GPT が上昇していたことから、運動によって肝臓も傷害されたことが示唆された。

血漿 α -トコフェロール濃度が運動後に上昇したことは、第 1 節でのより短時間の

運動時と同様の変化で、運動で増加する活性酸素に対処するための生体応答が、20 km ランニングでも起きたことが考えられた。

第3節 トライアスロン

20 km ランニングよりもさらに長時間のトライアスロンにおける変化を検討した。

研究方法 (Fig. 1-3-1)

対象；トライアスロンに参加した成人男子選手 17 名 (33 ± 7 才) を対象にした。

対象者には、実験に先立って目的を説明し参加の同意を得た。

運動負荷および採血；研究対象としたトライアスロンは水泳 3.9 km、自転車 180 km、ランニング 42km からなる競技であった。採血は、競技の 2 日前の早朝空腹時、競技直後、競技翌日の早朝空腹時の 3 回おこなった。

測定項目；血漿 TBARS (過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株)、LPO (デタミナーLPO、協和発酵)、CK (メルクオート CK、関東化学)、ミオグロビン (ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ研究所)、尿酸 (HPLC 法)、 β -カロテン (HPLC 法)、アスコルビン酸 (HPLC 法) の濃度を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。P<0.05 を有意とした。

研究結果

運動時間

競技に要した平均時間は 9 時間 59 分 (8 時間 49 分～11 時間 23 分) であった。

血清尿酸濃度 (Fig. 1-3-2)

血清尿酸濃度は、運動直後および翌日で運動前にくらべて有意な高値を示した。

血漿 TBARS および LPO 濃度 (Fig. 1-3-3)

血漿 TBARS および LPO は、運動直後および翌日で運動前にくらべて有意な低値を示した。

血清 CK およびミオグロビン濃度 (Fig. 1-3-4)

血清 CK は、運動直後で運動前値にくらべて有意に上昇し、翌日にはさらに上昇した。血清ミオグロビンは、運動前値に対して運動直後に上昇したが、翌日には低下し前値との差はなかった。

血漿 β -カロテンおよびアスコルビン酸濃度 (Fig. 1-3-5)

血漿 β -カロテン濃度は有意ではないが運動直後に低下傾向にあり、翌日にさらに低下する傾向にあった。血漿アスコルビン酸濃度は、運動直後で運動前値にくらべて有意に上昇し、翌日には前値付近まで低下した。

考察

本研究で、トライアスロン直後に血清 CK は 1400 U/l に上昇した。これは第 2 節の 20 km ランニング直後の 268 U/l よりも約 5 倍高かった。さらに、血清 CK はトライアスロンでも翌日にさらに上昇した (2647 U/l)。これも 20 km ランニングの 24 時間後の 375 U/l の約 7 倍であった。これらのことは、トライアスロンの方が組織損傷の程度が大きかったことを示唆している。

長時間の運動後の血中 CK レベルに関しては、80 km 走行後で 869 U/l⁶⁹⁾、100 km 走行後で 1936 U/l⁹²⁾、および 6368 U/l⁹³⁾、4 日間、毎日 80 km を行軍した後で 1860 U/l⁹⁴⁾ に上昇したとの報告がある。また、24 時間の歩行では 540 U/l および 4693 U/l に上昇したと報告されている⁹⁰⁾。これらの値は、ハーフマラソン後の 187 U/l⁶²⁾、マラソン後の 130 U/l³⁴⁾ や 437 U/l⁹⁵⁾ よりも高く、運動が長いほど血中 CK レベルが高くなることを示している。

血中 CK レベルは、運動直後よりも 6 時間後²³⁾ や翌日以降^{34, 62, 73)} の方が高いことが報告されており、本研究結果もそれらと一致した変化を示した。

血清尿酸濃度はトライアスロンでも運動後に 404 μ M に上昇し、活性酸素の生成が増加したことが示唆される。尿酸濃度はマラソンで 430 μ M に³⁴⁾、4 日

Subjects, 17 triathletes

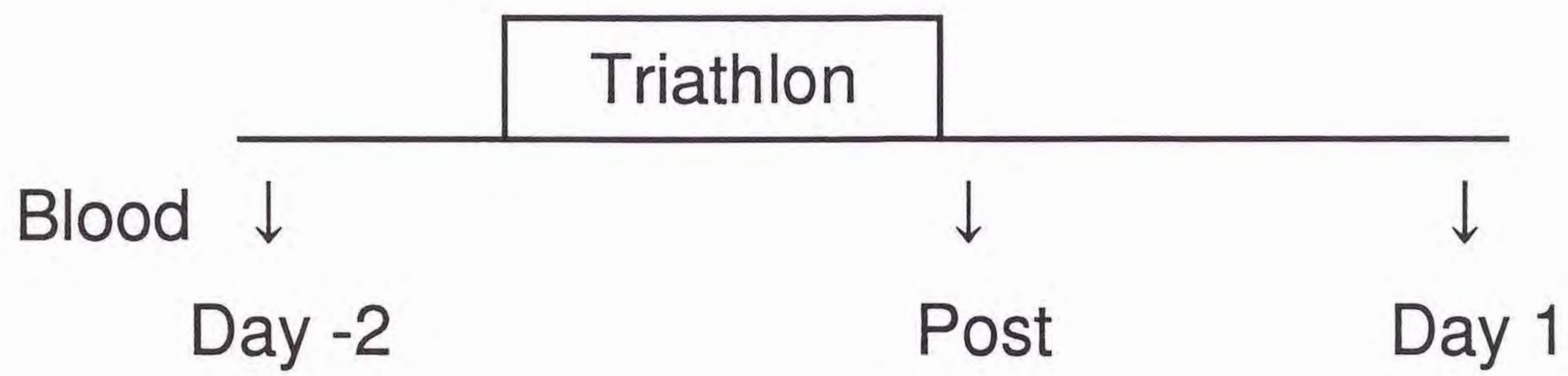


Fig. 1-3-1 Outline of study protocol

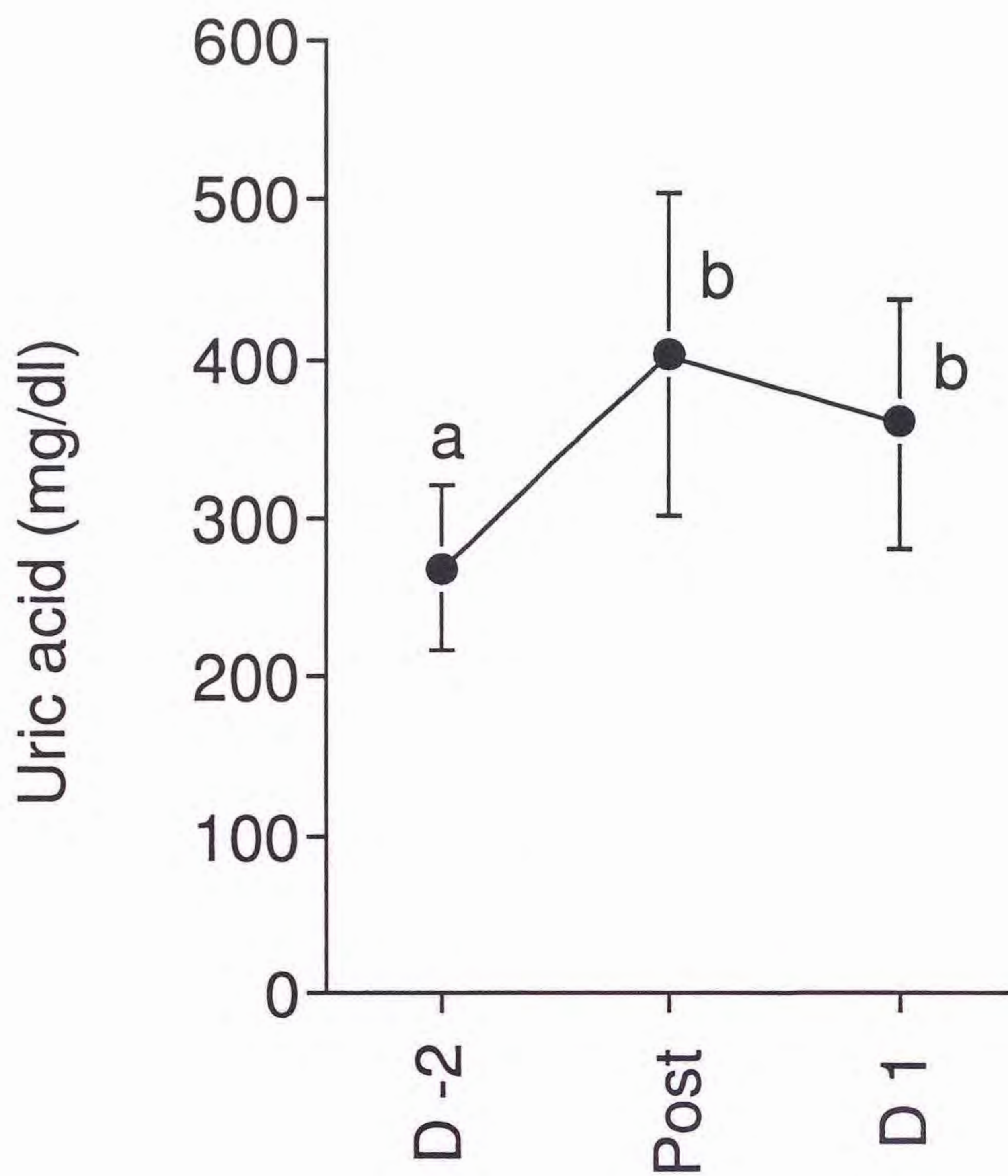


Fig. 1-3-2 Effect of triathlon on serum uric acid. Means \pm SD , n=17. Values with different letters are significantly different.

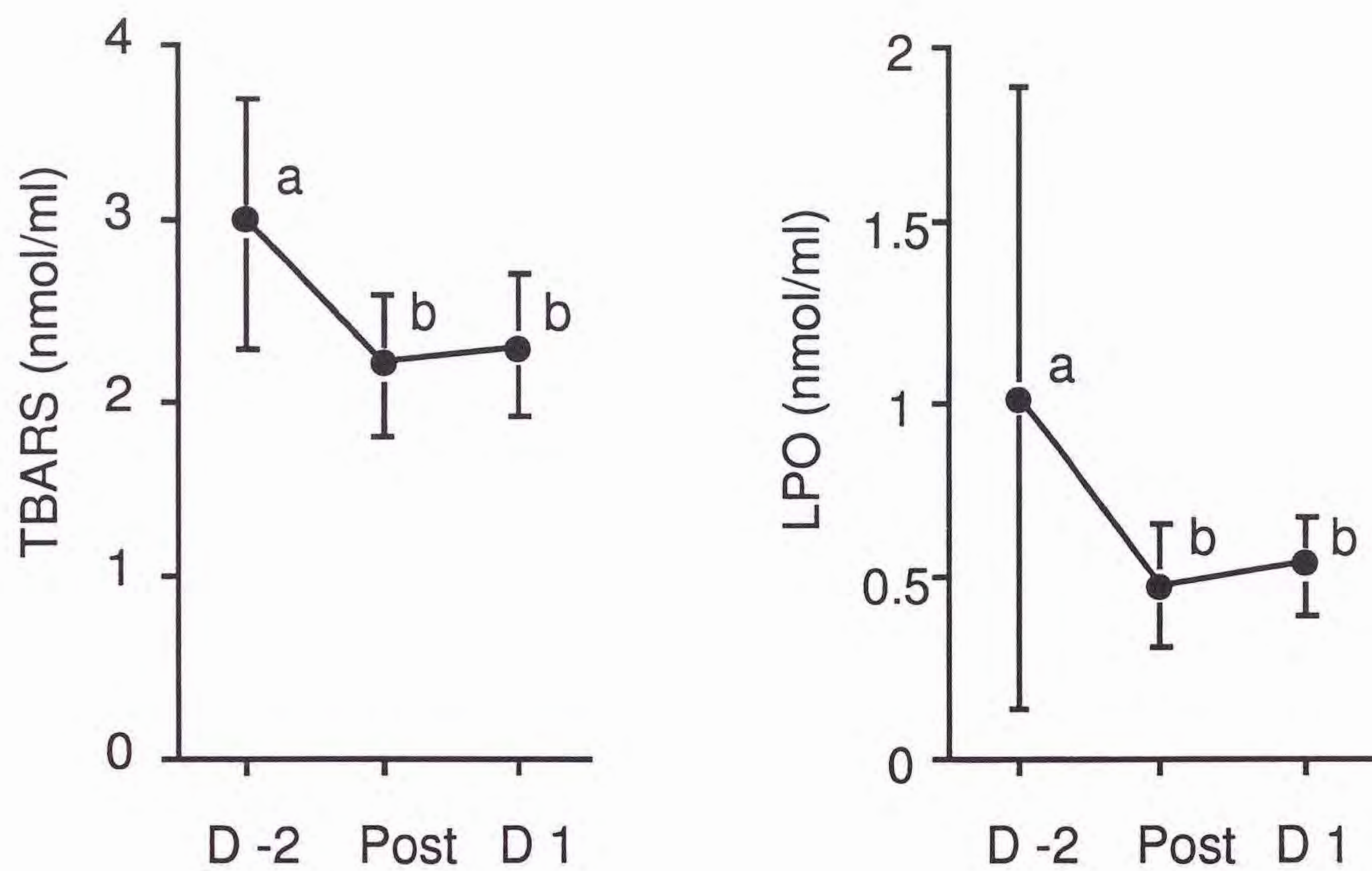


Fig. 1-3-3 Effect of triathlon on plasma TBARS and LPO. Means \pm SD , n=17. Values with different letters are significantly different.

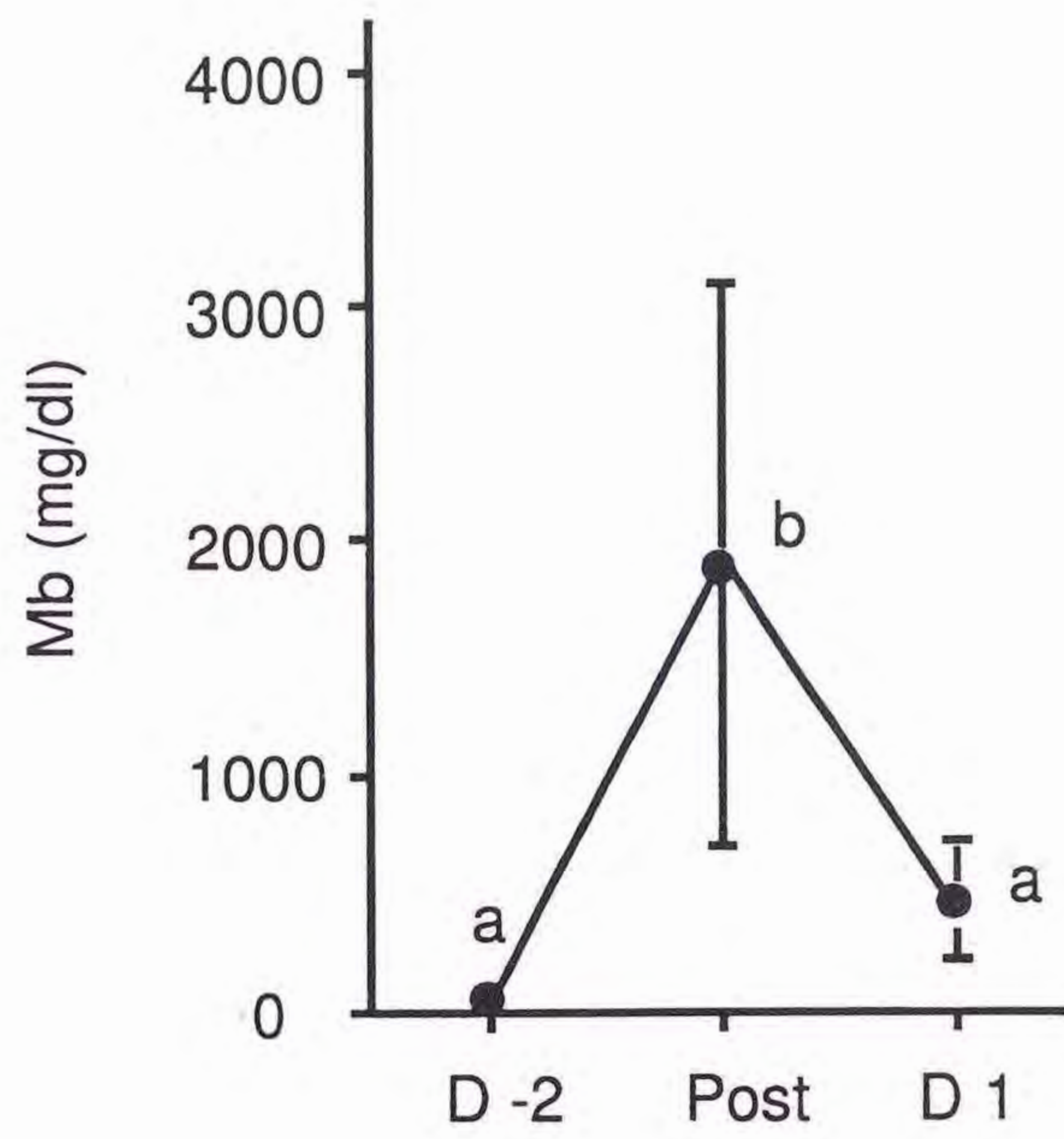
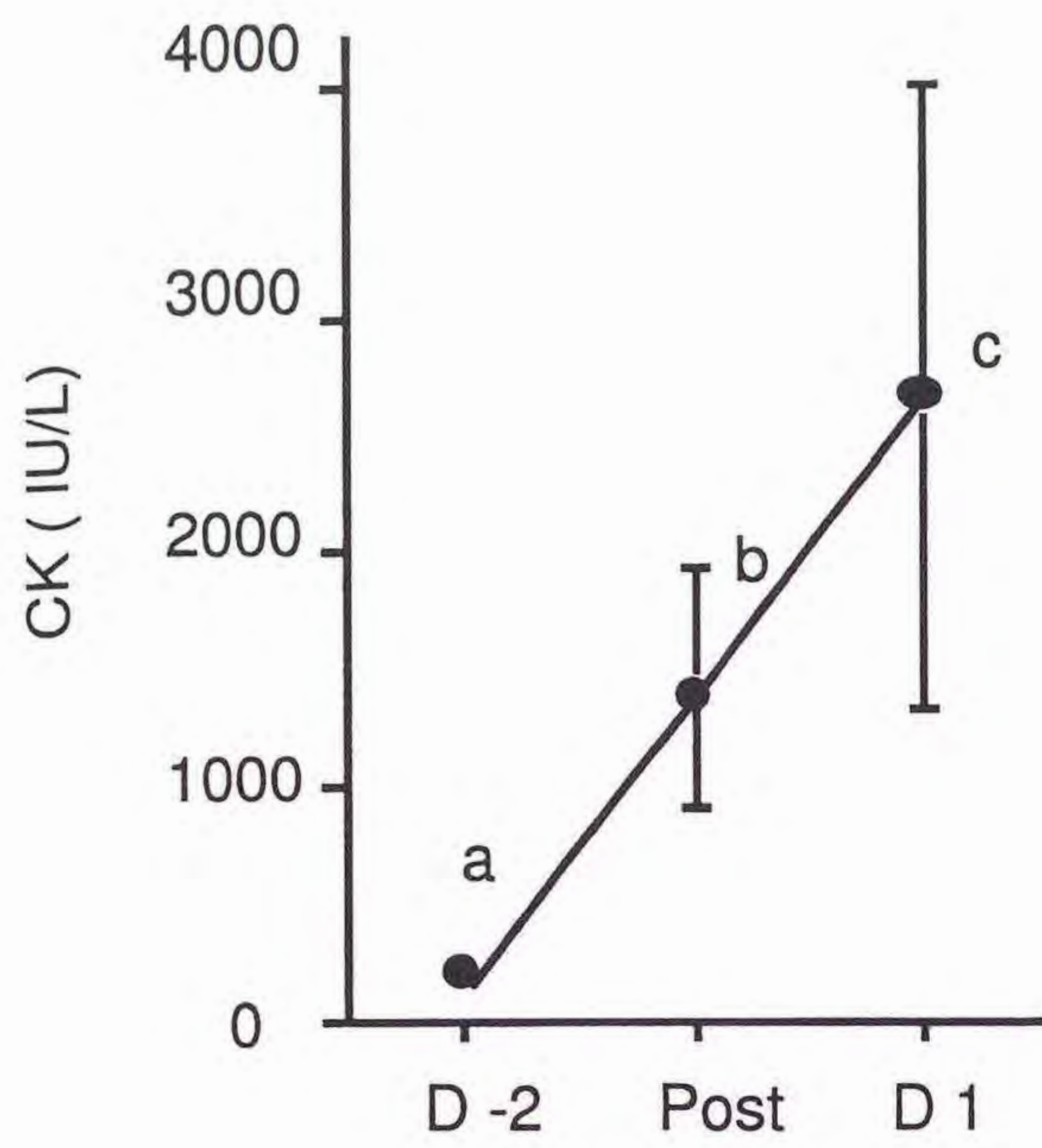


Fig. 1-3-4 Effect of triathlon on serum CK and myoglobin. Means \pm SD, n=17. Values with different letters are significantly different.

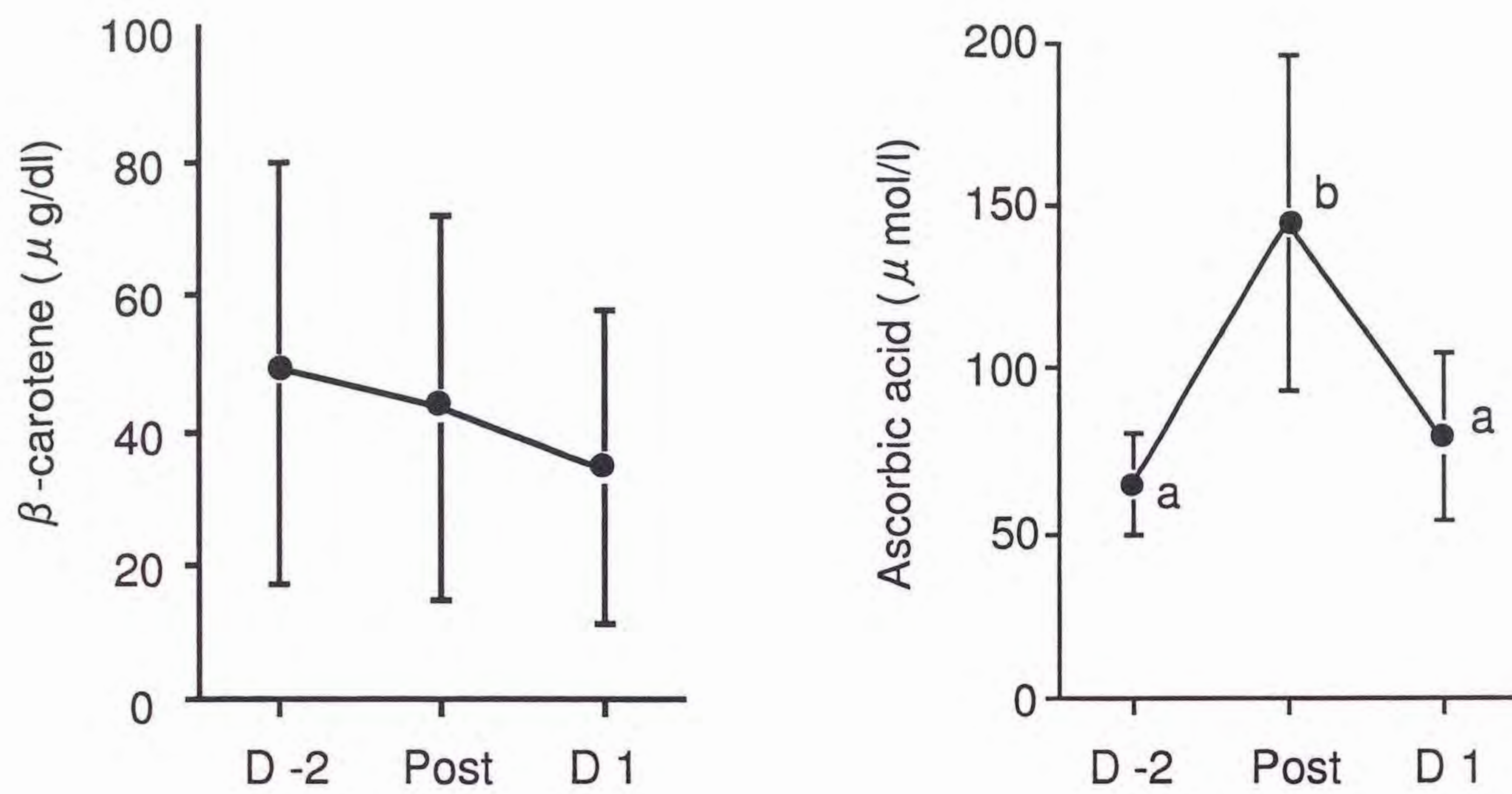


Fig 1-3-5 Effect of triathlon on serum β -carotene and ascorbic acid. Means \pm SD, n=17. Values with different letters are significantly different.

間の行軍で $488 \mu\text{M}$ へ上昇したことが報告されている⁹⁴⁾。第2節での20 km ランニング直後の値は $344 \mu\text{M}$ であった。これらのことは、運動が長時間に及ぶほど尿酸濃度の上昇が大きいことを示唆している。

本研究で、血漿 TBARS 濃度が運動後に低下したことは、20 km ランニングでの結果と一致している。しかし、トライアスロンよりも運動時間および距離の短いウルトラマラソン (80 km) で血中 TBARS 濃度が上昇したという報告⁶⁹⁾とは異なっていた。血漿 TBARS は強度の高い運動では上昇するが、強度の低い運動では上昇しないことから^{7,37,68)}、トライアスロンは時間は長いものの、競技中の運動強度がウルトラマラソンよりも低かったために、血漿 TBARS 濃度の変化が異なったのかもしれない。

血清アスコルビン酸濃度が運動後に上昇したことは、持久的な運動のハーフマラソン^{62,76)} およびマラソンで上昇した³⁴⁾という報告と一致する変化である。また、アスコルビン酸が翌日に低下したのもマラソンでの変化³⁴⁾と一致している。血漿 β -カロテンはマラソン直後には変化しないが、翌日に低下傾向を示すことが報告されている³⁴⁾。本研究では血清 β -カロテン濃度は、有意ではなかったが、トライアスロンの直後、そして翌日にかけて低下する傾向があり、マラソンでの知見と基本的に一致していると考えられる。これらのことは、運動によって β -カロテンの消費が高まっており、それが翌日まで持続していたことを示唆している。第1節から第3節までで、強度および時間の異なる運動で検討したが、いずれの運動でも β -カロテンの血中濃度は低下し、アスコルビン酸や α -トコフェロールが上昇するのとは逆の変化を示した。運動時にはこれらの抗酸化物質の消費が高まっているものと推測されるが、 β -カロテンだけが低下する事は興味ある知見である。しかし、その理由は不明である。

要約

第2節の20 km ランニングよりもさらに長時間のトライアスロンにおける変化を検討した。運動後に血漿尿酸濃度が上昇したことから、活性酸素の生成が増大したことが認められた。

血漿 TBARS 濃度が運動後に低下したことは、持久的な運動である 20 km ランニングと一致した。血中逸脱物の運動後の上昇は、これまでに検討した運動中でもっとも顕著だった。

血漿 β -カロテン濃度は運動後に低下傾向を示し、アスコルビン酸は上昇した。この変化はこれまでの運動での結果と同じであった。

第4節 激運動の反復（合宿）

前節までは運動強度・時間の異なる一回の運動の影響を検討した。本節では強度が高く時間も長い運動を連日おこなった場合の影響について、陸上長距離選手の合宿を対象として検討した。

研究方法（Fig. 1-4-1）

対象；大学陸上部の長距離選手 10 名を対象とした。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動；夏の強化合宿を研究対象とした。合宿中の運動は早朝と夕方のランニングと午前中のウエイト・トレーニングおよびジョギングであった。一日あたりの平均走行距離は 30 km だった。

採血；採血は合宿に入る前の対照期（control; cont）、合宿 1 日目（Day 1; D1）、合宿終了日の翌朝（Day 9; D9）の 3 回、一夜絶食状態でおこなった。

測定項目；血漿 TBARS（過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株）、LDH（LDH-HR、和光純薬工業株）、CK（メルクオート CK、関東化学）、CK-MB（メルクオート CK-MB、関東化学）、ミオグロビン（ミオグロビンキット「第一」、第一アイソトープ研究所）、 β -カロテン（HPLC 法）、 α -トコフェロール（HPLC 法）の濃度を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合 Fisher's PLSD 検定をおこなった。 $P < 0.05$ を有意とした。

研究結果

血漿 TBARS 濃度（Fig. 1-4-2）

血漿 TBARS は、D1（1 日目）で cont にくらべて低値だった。合宿前後の比較では D9（9 日目）が D1 よりも高値で、合宿後に上昇したことが認められた。

血清 LDH、CK、CK-MB およびミオグロビン濃度 (Fig. 1-4-3)

血清 LDH、CK、CK-MB およびミオグロビン濃度はすべて、D9 が D1 よりも有意に高かった。

血漿 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度 (Fig. 1-4-4)

血漿 β -カロテン濃度は研究期間中に有意な変化は認められなかった。血漿 α -トコフェロール濃度は、D9 が D1 および cont にくらべて有意に高かったが、合宿前と D1 とには差は認められなかった。

考察

合宿後の血清 CK は 1349 U/l であり、これはマラソン後の 130 U/l³⁴⁾ や 437 U/l⁹⁵⁾ よりも高く、1 日 80 km を 4 日間の行軍した後の 1860 U/l⁹⁴⁾ に匹敵するほどの高値であった。LDH は行軍のときの 713 U/l にくらべて本研究では 557 U/l であり、やや低かった。

本研究では合宿前の D1 で cont にくらべて LDH が有意に高く、他の CK、CK-MB、Mb も上昇する傾向にあった。これは、対象者が合宿前の期間にも合宿中よりも少ないものの、ある程度のトレーニングをおこなっていたことに起因すると考えられる。

血漿 TBARS 濃度は合宿後に上昇しており、酸化的傷害も増大していたことが示唆された。第 3 節までに検討した一過性の運動後には血漿 TBARS 濃度の上昇は認められず、持続的な運動では低下することを認めた。本研究では合宿後の採血は合宿中の最後のトレーニングから約 24 時間を経過した時点でおこなっており、一過性の運動直後とは血液を採取した条件が異なった。血清 TBARS 濃度は 45 分間の運動の直後には有意な上昇は認められないが、6 時間後から 48 時間後まで有意な高値が持続することが報告されている²³⁾。また、肝臓の TBARS も運動の直後には上昇が認められないが、運動の 24 および 48 時間後に上昇したとの報告がある²⁶⁾。したがって、本研究では運動後の回復期に TBARS が体内で生成され血中濃度が上昇した可能性が考えられる。

Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6:00	Blood	14 km run		13 km run	14 km run	7 km run	7 km run	13 km run	Blood
8:00									
10:00		WT 5 km jog	WT 5 km jog	WT 5 km jog	WT 5 km jog	WT 5 km jog	WT 5 km jog		
noon									
14:00									
16:00	16 km run	22 km run	BG 5 km run	16 km run	25 km run	BG 5 km run	30-40 km run		
18:00									

Fig. 1-4-1 Training menu during the camp. Blood, blood sampling; WT weight training, BG, ball game. The training on the afternoon of day 8 was cancelled due to bad weather.

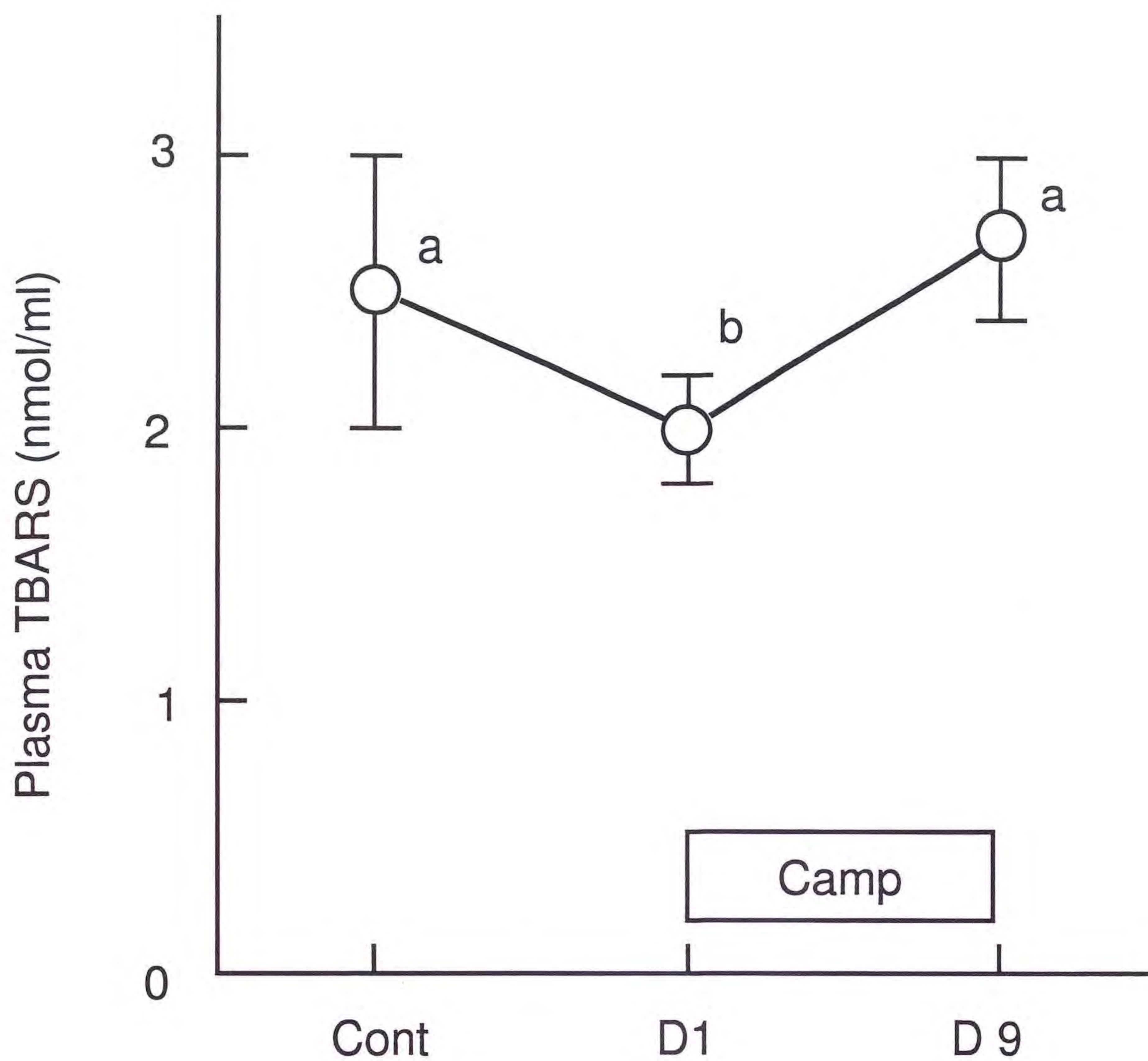


Fig. 1-4-2 Plasma TBARS. Means \pm SD , n=10. Values with different letters are significantly different.

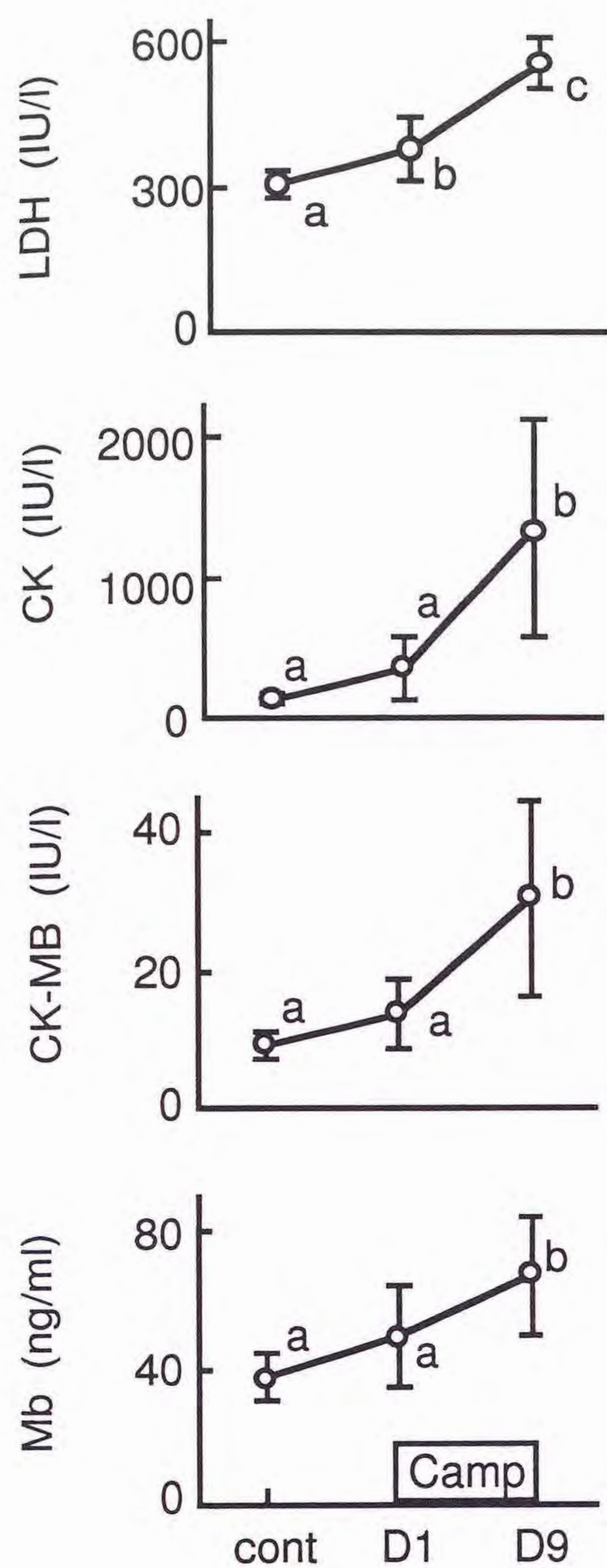


Fig. 1-4-3 Changes in serum LDH, CK, CK-MB, and myoglobin during the training camp. Means \pm SD, n=10. Values with different letters are significantly different.

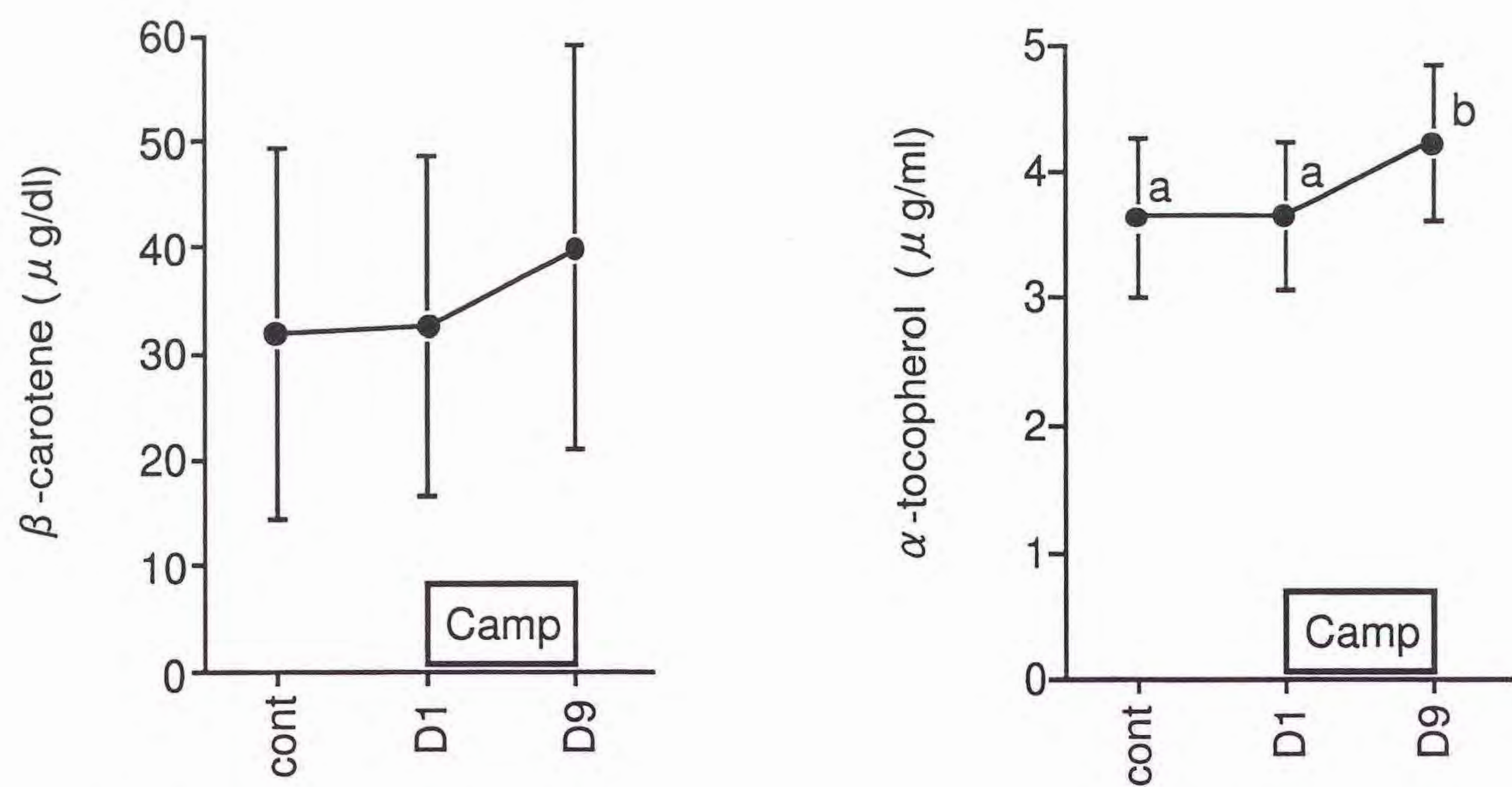


Fig. 1-4-4 Plasma β -carotene and α -tocopherol. Means \pm SD, n=10. Values with different letters are significantly different.

血漿 β -カロテン濃度は合宿後に変化しなかった。一方、 α -トコフェロール濃度は合宿後に上昇した。第1節から第3節までの研究において、運動後に血漿 β -カロテンは低下傾向を示し、 α -トコフェロールは上昇傾向を示したことから、本研究の合宿でも、毎日のトレーニングの後では同様の変化が繰り返し起きていたと推測される。 α -トコフェロールは一過性の運動によって貯蔵部位からの動員が増加し、血中濃度が上昇するとされている^{75, 64)}。したがって、本研究で合宿後に血漿 α -トコフェロール濃度が上昇したのは、合宿中に一過性の運動が繰り返されるたびに動員が起きたためと推測される。筋肉中の α -トコフェロール含量はトレーニングによって減少することが報告されている^{96, 97)}。一方、筋肉中の α -トコフェロール含量はトレーニングによって変化しないという報告もある^{93, 99)}。本研究で筋肉の損傷の指標である血中逸脱物が合宿後に上昇したことは、 α -トコフェロールが血漿濃度からは不足は認められなかったものの、筋肉中では不足していたことを示唆している。筋肉のミトコンドリア中の α -トコフェロールは、トレーニングによるエネルギー代謝の亢進に見合って増加せず、相対的に不足するとの報告があり¹⁰⁰⁾、合宿中に筋肉内で α -トコフェロールが不足していたという仮説を支持するものと考えられる。 β -カロテンの組織レベルに対する運動の影響に関しては知られていない。 α -トコフェロールと同様に血漿レベルからは不足は認められないものの、要求されている部位では不足していたことも考えられる。

激しい運動を反復することは、抗酸化栄養素の要求量を増大することが推察される。本研究では血中 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度は、合宿によって変化しなかった。しかし、組織損傷が起きたことは、激しい運動をおこなう場合にはこれらの抗酸化栄養素が必要な部位で不足していたことを示唆していると考えられる。

要約

高強度・長時間の運動が連日おこなわれた場合の影響を、陸上長距離選手の合宿で検討した。

血漿 TBARS 濃度が合宿後に上昇したことから、脂質過酸化が合宿中に増加した

ことが示唆された。また、血清逸脱物も合宿後に上昇したことから、組織損傷が起きたことが認められた。血漿 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度は合宿前後で変化しなかった。しかし、脂質過酸化および組織損傷が起きたことから、これらの抗酸化栄養素の必要量が満たされていなかったことが示唆された。

第2章 運動が8-OHdGに及ぼす影響

第1節 長時間の運動（イヌ組織およびリンパ球）

運動中の酸素消費量が多いことから、活性酸素の生成も多いと考えられる長時間の運動において、組織およびリンパ球のDNA中の8-OHdG含量を測定することによって運動が、DNAの酸化的傷害に及ぼす影響を検討した。

研究方法

動物；12頭のビーグル犬（14ヶ月令、体重 9.8 ± 0.9 kg、CSK リサーチ・パーク、長野）を用いた。動物は実験に先だってトレッドミル走に馴化させた。市販固形飼料（DS-5、オリエンタル酵母、東京）とイヌ缶飼料（ペディグリー、Master Food、東京）を混合したものを毎日16:00に与えた。実験前に運動群6頭と非運動群6頭とに分けた。

運動負荷；プロトコールの概要をFig. 2-1-1に示した。運動前に心拍数を測定するための電極を装着した。トレッドミルは昇り傾斜12%とし、時速は6~8 kmで心拍数がおおよそ200 bpmになるように動物ごとに調節した。ビーグルの安静時心拍数は約80 bpm、最高心拍数は280 bpm¹⁰¹⁾なので、相対運動強度は心拍予備の約60%と判断された。実験の前日の17:00より絶食させ、運動は09:00より開始し、2時間×3セットと1時間×1セットの計7時間とした。各セット間に5分間休息させ水を自由に摂取させた。非運動群も実験前日の17:00より絶食させた。

運動群の動物は、運動前および運動後に伏在静脈よりリンパ球を採取するために採血した。運動群の動物は、運動後の採血終了後速やかにペントバルビタールを静注して屠殺した。非運動群も同時に屠殺した。屠殺後、速やかに脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、大腸、横隔膜、心臓、板状筋、腓腹筋（内側頭および外側頭）を採取し、組織は液体窒素中でアルミニウム製クランプで処理し、分析まで-80℃で保存した。

リンパ球のDNA抽出；リンパ球をLeucoPREP（Becton Dickinson, Lincoln Park,

NJ, USA) を用いて分離し、DNA は市販キット DNA extractor WB (和光純薬工業(株)、大阪) で抽出した。組織およびリンパ球 DNA 中の 8-OHdG 含量は Yamamoto ら¹⁰²⁾ および Loft ら⁴⁶⁾ の方法を改変しておこなった¹⁰³⁾。

組織 DNA の抽出 ; 組織サンプルは 2.5 ml の氷冷した 0.1M EDTA を含む pH 8.0 の 0.15M NaCl 溶液中でポリトロン・ホモジナイザー (Kinematica, Luzern, Switzerland) を用いてホモジナイズした (5,000 rpm、3 秒間×3 回)。ホモジネートを別の試験管に移し、1,500 × g、4℃で 10 分間遠心した。上清を除去後、4 ml の上述の buffer を加え、ゆるやかに撹拌した。1.5 ml を別の試験管に分取し 30 units の proteinase K (Boehringer Mannheim) および 2% SDS を含む 0.1 M NaCl、pH 8.0 を 2 ml 加えた。試験管内をアルゴンガスで置換して 50℃に 30 分間おき、その後 0.4 ml の 2M sodium acetate buffer と 8 ml の-20℃に冷やした isopropanol を加えて DNA を沈殿させた。沈殿した DNA を別の試験管に取り、4ml の 70% ethanol で洗浄した。Ethanol 除去後に DNA を 1ml の 1M EDTA に溶解したものを 1.5ml の冷 isopropanol で再沈殿させ、4ml の 70% ethanol で洗浄した。最後に ethanol を除去しサンプルを減圧下で 3 分間乾燥した。

DNA の酵素消化 ; DNA は抽出後に 100 μ l の 1 mM EDTA に溶解し 95℃で 5 分間加熱した。1 μ l の 2M sodium acetate (pH4.5) と 50 μ l の nuclease P1(Sigma) を添加して 37℃に 1 時間置いた後、16 μ l の 1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) と 1.14 units の alkaline phosphatase (type III, Sigma) を加え、37℃に 1 時間置いた。その後、4℃、13,000 rpm で 3 分間遠心し、上清の 8-OHdG とデオキシグアノシン (dG) を測定した。

8-OHdG および dG の測定 ; 上述の上清 100 μ l を LiChrospher 100 RP-18 カラム (4.0 mm x 150 mm, Merck, Darmstadt, Germany) に導入し、acetonitrile (1.5% v/v) 、methanol (1.5% v/v) 、EDTA (5 mg/ml) を含む 100 mM phosphate buffer (pH2.2) にて 1 ml/min で溶出した。dG 濃度は UV monitor (L-4250, UV 検出器、日立) で 290 nm の吸収より定量した。リンパ球 DNA 中 8-OHdG 含量は、analytical cell (model 5011,

ESA, Bedford, MA, USA, detector 1: 150mV, detector 2: 300mV)と guard cell (model 5020, ESA, 350 mV)を装着した ECD (Coulchem II, ESA)で測定した。組織 DNA 中 8-OHdG 含量は conditioning cell (model 5021, ESA, 70 mV)を装着した ECD (ECD-100, 750 mV, EICOM, 京都)で測定した。8-OHdG 含量は 8-OHdG のピーク面積と dG のピーク面積の比で表した。8-OHdG の標品は葛西らの報告⁴⁷⁾に従って合成し、dG の標品は和光純薬工業(株)より購入した。

統計；運動前後の組織 DNA 中 8-OHdG 含量は、一元配置分散分析で有意性が認められたときに t-検定で比較した。リンパ球 DNA 中 8-OHdG 含量は対応のある t-検定で比較した。P<0.05 を有意とした。

研究結果

組織 DNA 中 8-OHdG 含量 (Fig. 2-1-2)

大腸で運動直後に 8-OHdG レベルが低下することを認めた。その他の組織においては運動前後で有意な変動を認めなかった。

安静時の DNA 中の 8-OHdG レベルには組織間で差が見られた。肝臓における含量は ($2.14 \pm 1.67/\text{dG} \times 10^5$) は横隔膜 ($1.75 \pm 0.52/\text{dG} \times 10^5$) と板状筋 ($1.77 \pm 1.66/\text{dG} \times 10^5$) を除く他の組織よりも有意に高かった。板状筋のレベルは、脾臓 ($0.98 \pm 0.30/\text{dG} \times 10^5$)、心臓 ($1.20 \pm 0.13/\text{dG} \times 10^5$)、横隔膜、腓腹筋内側頭 ($1.22 \pm 0.40/\text{dG} \times 10^5$) 以外の組織よりも有意に高かった。横隔膜のレベルは脳 ($0.34 \pm 0.05/\text{dG} \times 10^5$)、肺 ($0.45 \pm 0.09/\text{dG} \times 10^5$)、腎臓 ($0.41 \pm 0.09/\text{dG} \times 10^5$)、胃 ($0.42 \pm 0.10/\text{dG} \times 10^5$)、小腸 ($0.38 \pm 0.23/\text{dG} \times 10^5$)、大腸 ($0.83 \pm 0.24/\text{dG} \times 10^5$)、腓腹筋外側頭 ($0.82 \pm 0.17/\text{dG} \times 10^5$) よりも有意に高値であった。心臓の含量は脳、小腸よりも有意に多く、腓腹筋内側頭では脳、腎臓、小腸にくらべて有意な高値にあった。

リンパ球 DNA 中 8-OHdG 含量 (Fig. 2-1-3)

運動後に運動前値に比較して有意に減少した。

Animal,;12 beagle dogs

Exercise; treadmill running, 10 km/h, 12% incline

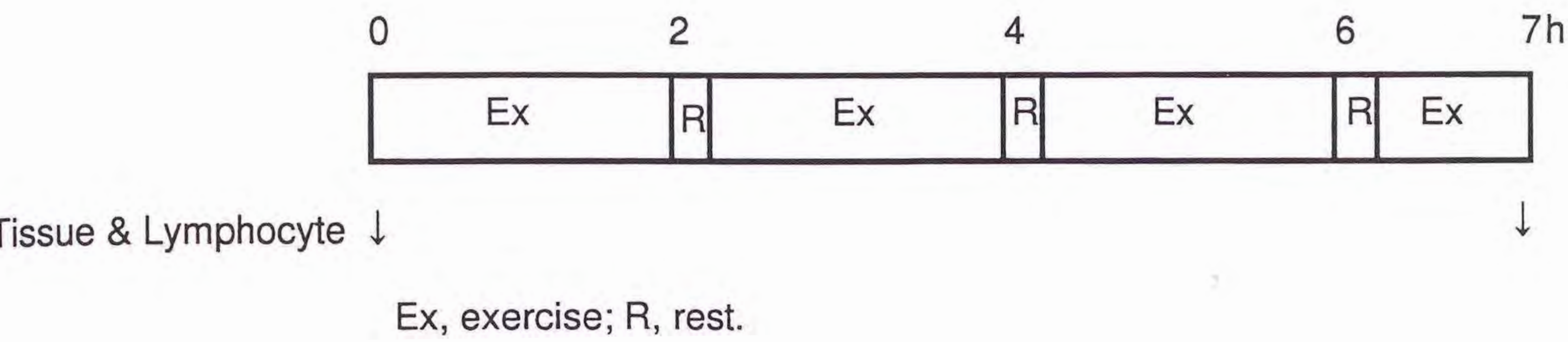


Fig. 2-1-1 Study design.

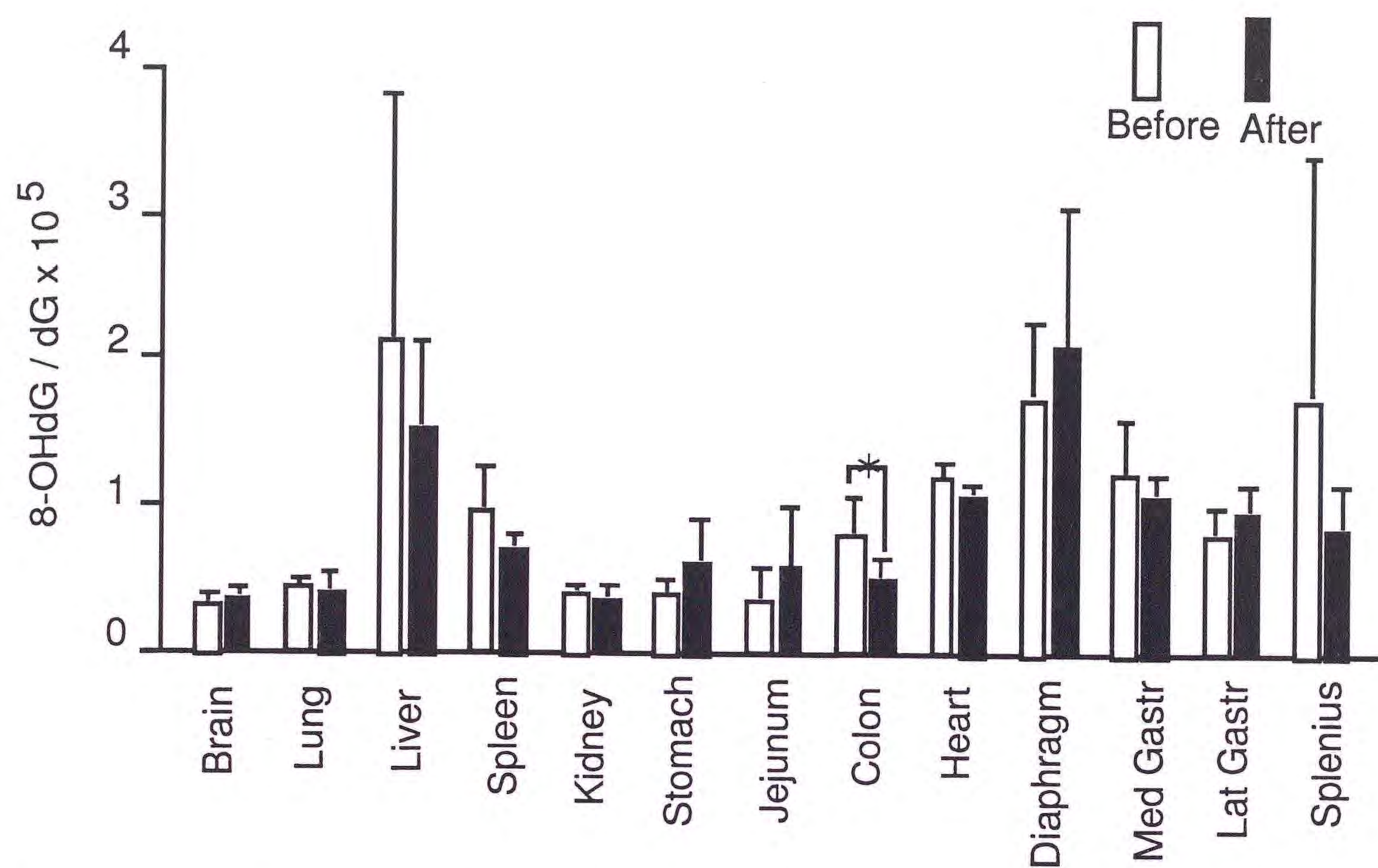


Fig. 2-1-2 The 8-OHdG content in the DNA of several types of tissue before and after exercise. Means \pm SD for 6 dogs

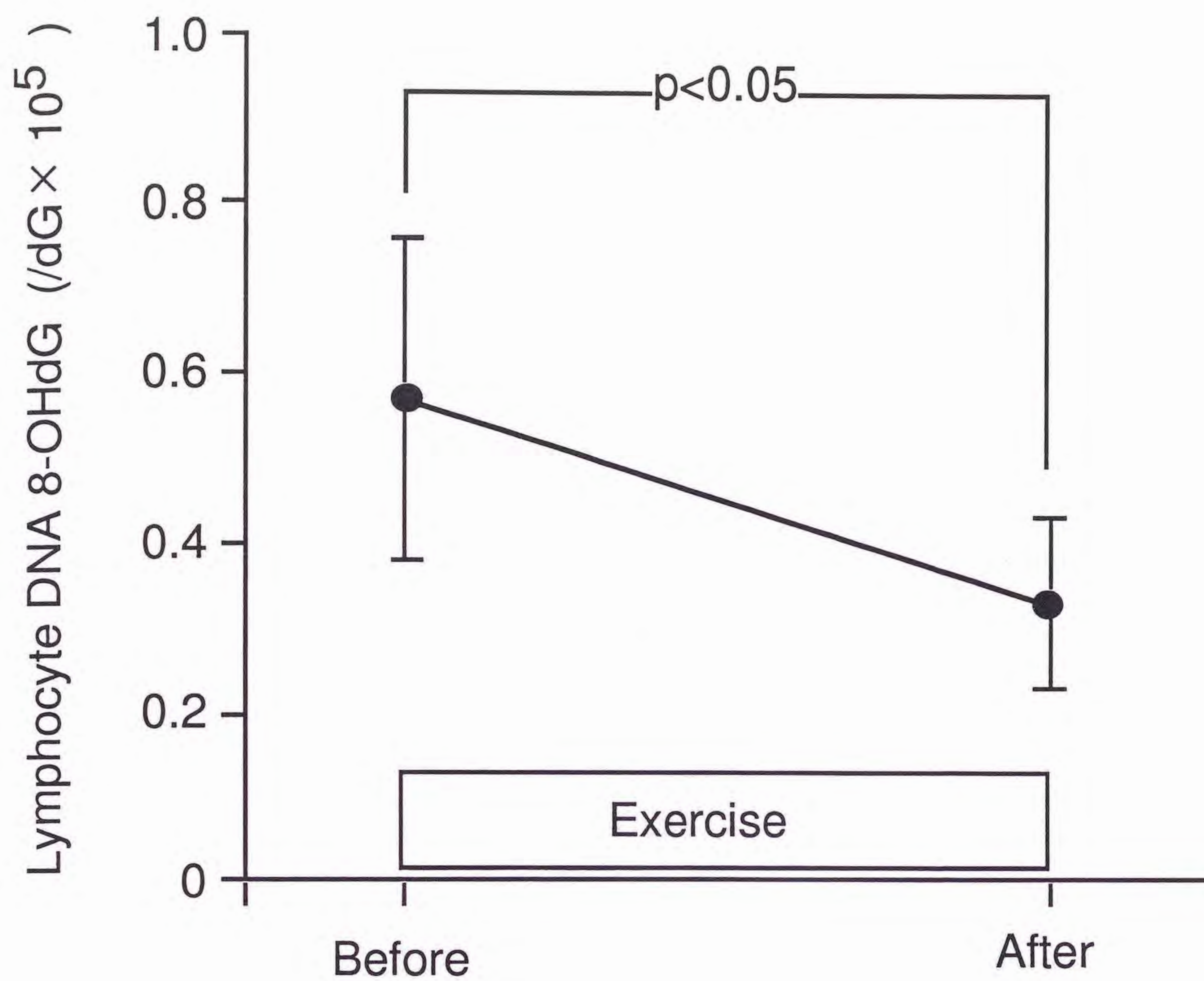


Fig. 2-1-3 Lymphocyte DNA 8-OHdG content. Means \pm SD for 6 dogs.

考察

本研究において、リンパ球 DNA 中 8-OHdG は運動後に有意に低下した。これは井上らの¹⁰⁴⁾ 報告と一致する。生体内には酸化傷害を受けた DNA から 8-OHdG を除去する修復酵素 (DNA glycosylase) が存在することが報告されており⁴²⁾、井上らは運動後のリンパ球で観察された 8-OHdG の減少は、この修復機構が亢進したことによると推察している。浅海らが¹⁰⁵⁾ 運動後に、ヒト好中球分画の 8-OHdG 修復酵素活性が増加する傾向を認めていることは、井上らの考察を支持している。

本研究では、大腸組織において 8-OHdG が減少することを認めた。この減少のメカニズムは現時点では明らかではないが、リンパ球の場合と同様に、運動が傷害を受けた DNA の修復を亢進したことが関与している可能性が考えられる。他の測定した組織では、運動による有意な変化は認められなかった。肝臓と板状筋では運動後の平均値が運動前にくらべて低かったが、運動前の個体差が大きかったために有意な減少に至らなかった可能性が考えられる。

部分尿による検討で、尿中 8-OHdG/クレアチニン比は、マラソンの 10 時間後に上昇することが報告されている¹⁰⁶⁾。井上らも 8-OHdG の尿中排泄が運動後に有意ではないが増加することを報告している¹⁰⁴⁾。本研究において、イヌは運動中に排尿したが、運動中の採尿が不可能だったために運動中の尿中 8-OHdG 排泄量が増加していたかどうかは明らかではない。しかし、DNA 中の 8-OHdG 含量の減少した組織があったことから、運動中に尿中排泄が増加していたことが推察される。

本研究結果は、運動直後には 8-OHdG の除去が促進され、DNA 中に 8-OHdG は蓄積しないことを示している。しかし、運動後の血中逸脱酵素の上昇が運動直後よりも 4 時間後以降で高いこと²³⁾、肝臓中の TBARS が運動直後よりも運動 48 時間後に上昇していたとの報告があり²⁶⁾、8-OHdG も運動の数時間後に上昇していた可能性が考えられる。

DNA 中の 8-OHdG 含量には組織間で差があった。DNA に対する酸化的損傷は酸素消費量に依存することが報告されている^{54, 55, 107)}。したがって、DNA 中の 8-OHdG 含量は酸素消費量の高い組織において多いことが推測される。Fraga ら¹⁰⁸⁾ はラットの腎臓、睪丸、脳、肝臓、小腸の 8-OHdG 含量を測定したところ、腎臓で他の組織

よりも高いことを認め、腎臓が他の組織にくらべて酸素消費が高いことによると考察している。本研究では腎臓における含量は肝臓よりも少なく、脳、小腸と差がなかった。肝臓の酸素消費量 (2.0 ml/100 g/min) は腎臓 (6.0 ml/100 g/min)、脳 (9.3 ml/100 g/min)、心筋 (9.7 ml/100 g/min) よりも少ない¹⁰⁹⁾。さらに、本研究では酸素消費の少ない筋肉 (0.2 ml/100 g/min) において¹⁰⁹⁾、肝臓を除くすべての組織よりも 8-OHdG 含量が高かった。これらのことは、DNA 中 8-OHdG 含量は組織の酸素消費量のみによって決定されるのではないことを示唆している。Fraga らの結果と本研究結果が異なる理由については不明である。

本研究で、運動直後にリンパ球および大腸で 8-OHdG 含量が低下していたことから、運動中には DNA から 8-OHdG を除去する酵素活性が亢進したことが示唆された。しかし、他の組織では運動直後に変化が認められなかったことから、運動中には DNA から 8-OHdG を除去する酵素活性の亢進と、運動時に増加する活性酸素種による 8-OHdG 生成の増加とが同程度に起きていたことが推測される。

要約

長時間にわたる運動を負荷したときのリンパ球ならびに組織 DNA 中の 8-OHdG 含量の変化を検討した。その結果、リンパ球と大腸において、運動後に DNA 中の 8-OHdG 含量が有意に減少することを認めた。他の測定した組織 (脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、横隔膜、心臓、板状筋、腓腹筋内側頭および外側頭) では運動後に有意な変化は認められなかった。以上のことから運動直後には組織 DNA 中の 8-OHdG 含量は増加せず、減少する場合のあることが示唆された。

第2節 漸増負荷で疲労困憊に至る運動

ヒトを対象とし、30分前後で一過性に疲労困憊に至る運動が尿中 8-OHdG 排泄に及ぼす影響を検討した。運動時の酸化ストレスに対する抗酸化能には鍛錬度が影響することが報告されているので^{29, 60)}、本研究では鍛錬者と非鍛錬者とを対象として検討した。

研究方法 (Fig. 2-2-1)

研究 1

対象；日常定期的に長距離ランニング運動を実施している健康で喫煙習慣のない男性 11 名を対象とした。対象者は、年齢 20.7 ± 0.5 才、身長 170.0 ± 0.02 cm、体重 58.6 ± 1.4 kg、最大酸素摂取量は 60.7 ± 0.7 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷方法；トレッドミルを用い、傾斜 0% で 180 m/min のスピードから開始し、2 分ごとに 10 m/min 増加させて疲労困憊に至るまでおこなった。

採尿；運動前の 24 時間および運動後の 24 時間の尿を採取した。採尿後尿量を測定し、8-OHdG およびクレアチニン濃度（クリニメイト CRE キット、第一化学）を測定した。

尿中 8-OHdG 濃度測定方法；

尿試料の調製

凍結保存した尿を 37℃ の恒温槽で 30 分間加温して沈殿を十分に溶解し、3,000rpm で 10 分間遠心して上清を得た。得られた上清 1 ml に 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.9) を 1ml 加えて激しく攪拌し、前処理用フィルターで濾過し、その 50 μ l を HPLC に注入して分析した。

HPLC による分析

尿中 8-OHdG の分析は、HPLC と電気化学検出器 (ECD) を用いる Loft らのカラ

ムスイッチング法に準じておこなった¹¹⁰⁾。10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH7.9)、13.5 μ M EDTA/メタノール/アセトニトリル = 96/1.5/2.5 (v/v)を移動相 I として、LiChrospher 100 RP-18 (4.0 mm ID x 250 mm, Merck, Germany) ODS カラムで 8-OHdG 標品のリテンションタイムを UV によって測定した。8-OHdG のリテンションタイムの前後 30 秒でバルブを切り換え、移動相 II のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2) 13.5 μ M EDTA/メタノール/アセトニトリル = 96/1.5/2.5 (v/v)で、陽イオン交換樹脂カラムと LiChrospher 100 RP-18 (4.0 mm ID x 250 mm, Merck, Germany) ODS カラムを用い、エイコム電気化学検出器によって、+750 mV で分析した。流速は移動相 I、II とともに 1.0 ml/min で、カラム恒温槽の温度は 30°C とした。

統計処理；対応のある t 検定を用いた。P<0.05 を有意とした。

研究 2

対象；日常定期的に運動を実施していない、健康で喫煙習慣のない男性 6 名を対象とした。対象者は、年齢 19.8 ± 0.3 才、身長 172.0 ± 2.9 cm、体重 61.9 ± 3.4 kg、最大酸素摂取量は 37.5 ± 2.2 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷方法；自転車エルゴメーターを用い 3 分間の座位安静の後、20W で 4 分間のウォーミングアップをおこない、その後 3 分ごとに 20W の負荷漸増法により疲労困憊に至るまでおこなった。疲労困憊による運動中止時点は、対象者の自覚的運動強度と本人の申し出により決定した。

採尿および分析；運動前 1 日尿および運動後の 1 日尿、2 日尿、3 日尿を採取した。採尿後尿量を測定し、8-OHdG を研究 1 に記述した方法で測定した。クレアチニン濃度はクリニメイト CRE キット（第一化学）を用いて定量した。

統計処理；一元配置分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test で検定した。P<0.05 を有意とした。

研究結果

研究 1

運動時間

疲労困憊に至るまでの時間は 25.4 ± 1.2 分だった。

尿中 8-OHdG 排泄量

鍛練者を対象にした疲労困憊運動では、運動後 24 時間後まで尿中 8-OHdG 排泄量に変化は認められなかった (Fig. 2-2-2)。

研究 2

運動時間

疲労困憊に至るまでの時間は 28.5 ± 1.8 分だった。

尿中 8-OHdG 排泄量

非鍛練者を対象とした疲労困憊運動では、運動後 3 日目まで尿中 8-OHdG 排泄量に変化は認められなかった (Fig. 2-2-3)。

考察

尿中 8-OHdG 排泄量は DNA の酸化的損傷と DNA 修復に由来すると考えられている^{46, 54, 55, 56, 57)}。尿中 8-OHdG 排泄量は酸素消費量に比例していることから^{54, 55, 107)}、酸素消費の増加する運動によって排泄量が増加する可能性が考えられる。

マラソンの 10 時間後に採取した部分尿において、尿中 8-OHdG/クレアチニン比が上昇したことが報告されている¹⁰⁶⁾。一方、運動時間や強度は不明だが、水泳および陸上競技の通常の練習後に採取した尿で、8-OHdG 排泄はわずかに増加するが有意な変化は認められていない¹⁰⁴⁾。本研究での運動は 25~30 分で疲労困憊にいたる一過性の激しい運動であった。したがって、上述のふたつの報告のうちではマラソンよりも日常の練習により近いものといえる。本研究では運動後の一時点で採取した尿ではなく全尿で検討した。しかし、運動後に尿中 8-OHdG 排泄量

Study 1. Trained subjects, treadmill running until exhaustion.

Before exercise	After exercise
Day 1	Day 1

Study 2. Untrained subjects, cycle ergometer until exhaustion.

Before exercise	After exercise		
Day 1	Day 1	Day 2	Day 3

Fig. 2-2-1 Outline of the protocol

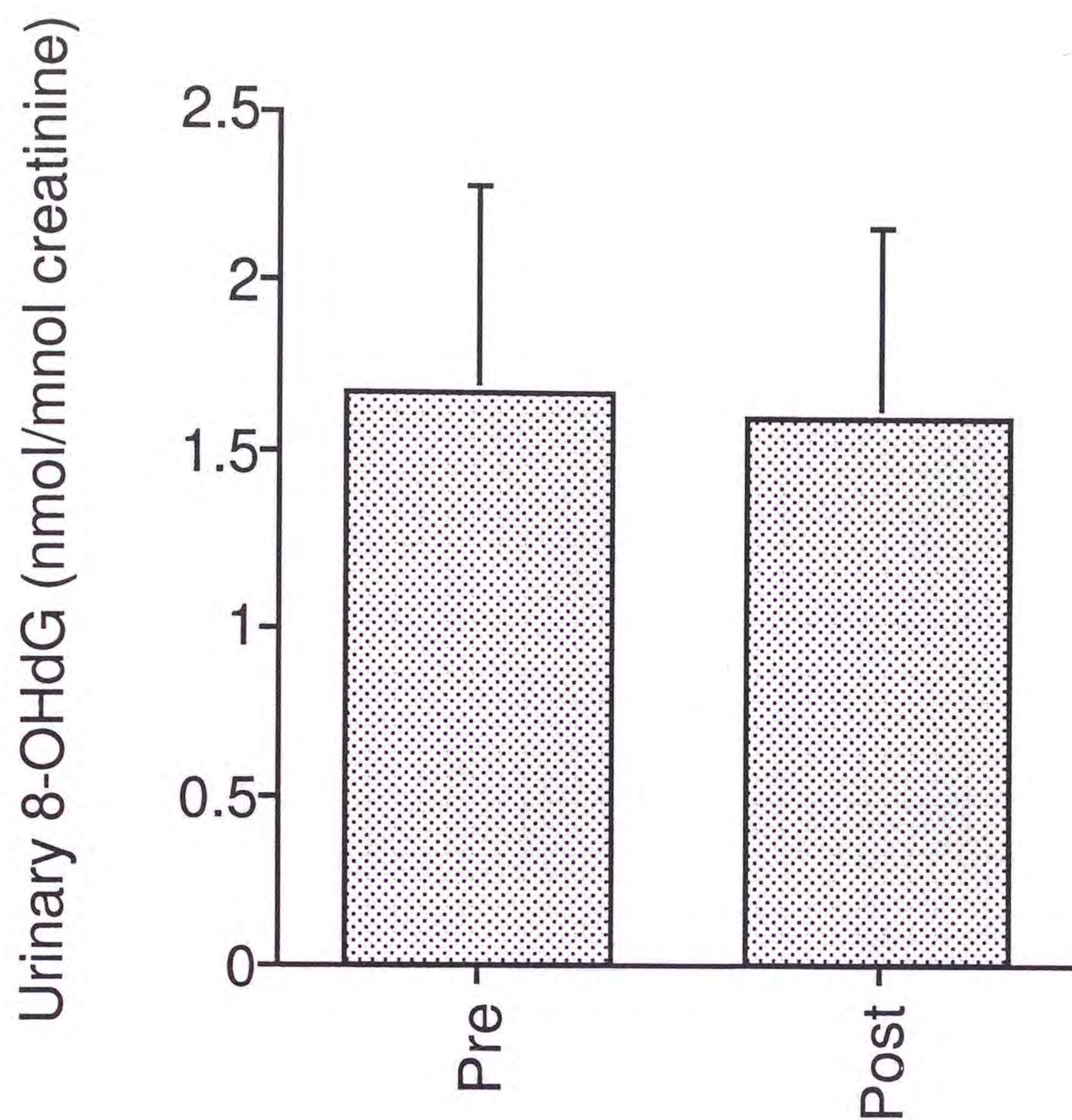


Fig. 2-2-2 Urinary excretion of 8-OHdG in trained subjects. Means \pm SD for 11 subjects.

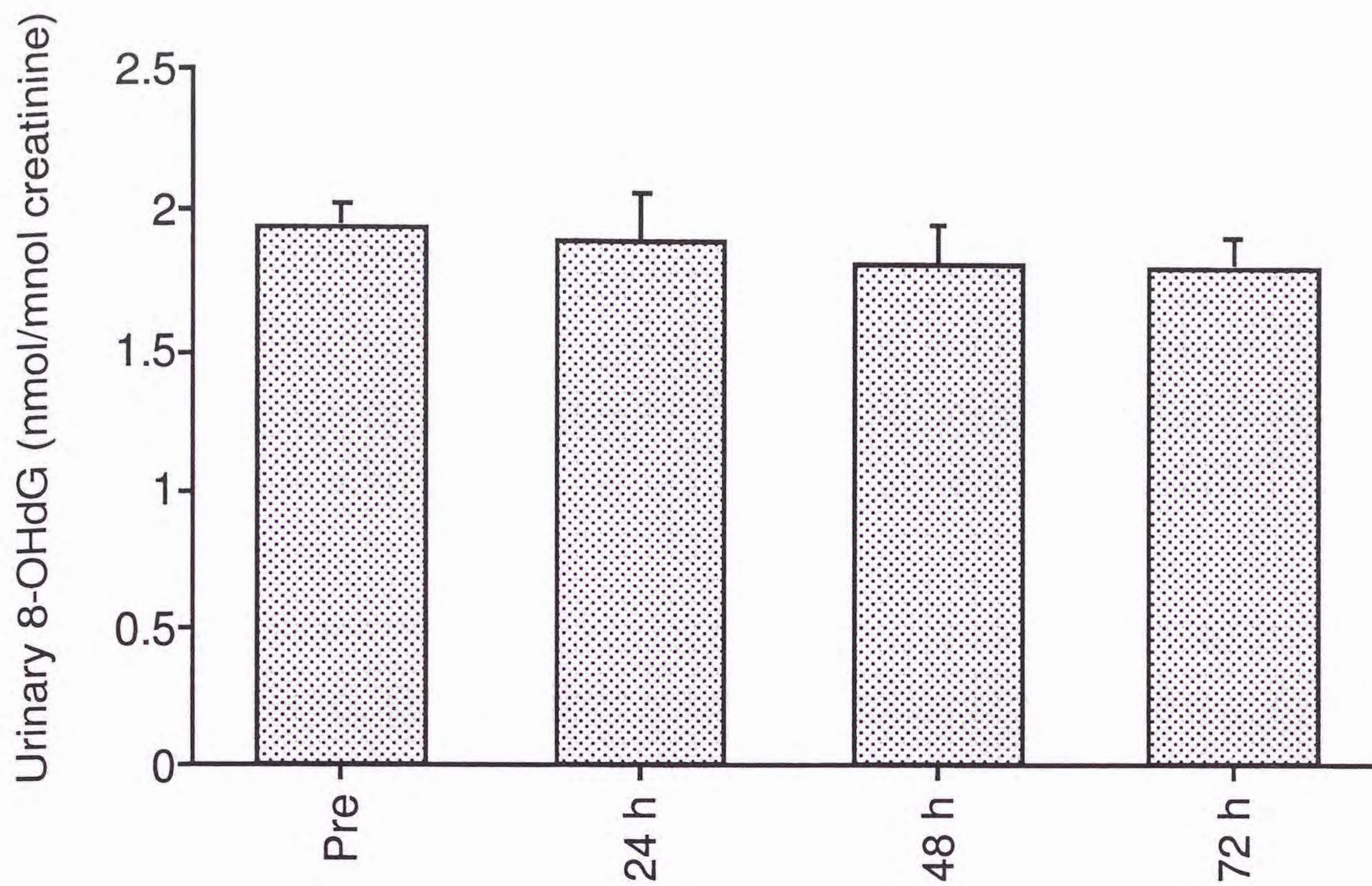


Fig. 2-2-3 Urinary excretion of 8-OHdG in untrained subjects.
Means \pm SD for 6 subjects.

に変化は認められなかった。

酸化ストレスの指標である TBARS は、運動直後よりも数時間後に上昇する^{23,26)}。肝臓 TBARS 含量は運動直後には増加しないが、運動の 24 及び 48 時間後に増加するとの報告がある²⁶⁾。すなわち、運動による酸化的損傷は運動後しばらく経過してから高まる可能性がある。そこで、本研究 1 で運動による尿中 8-OHdG 排泄量の変化を認めなかったのが、運動の翌日までしか検討しなかった可能性を考え、研究 2 では運動の 3 日後まで採尿した。しかし、3 日後まで検討しても尿中排泄に変化は認められなかった。

したがって、本研究で検討した 30 分程度で一過性の疲労困憊に至る運動では、DNA の酸化的損傷は、鍛練度の違いにかかわりなく起こらないものと考えられた。

要約

日常定期的に運動している鍛練者と定期的な運動は実施していない非鍛練者を対象に、30 分前後で一過性に疲労困憊に至る運動が尿中 8-OHdG 排泄に及ぼす影響を検討した。その結果、鍛練者では運動の翌日まで、非鍛練者では運動 3 日後まで 8-OHdG の尿中排泄量に変化は認められなかった。以上のことから、一過性に疲労困憊に至る運動は DNA に酸化的損傷を及ぼさないことが示唆された。

第3節 20 km ランニング

第2節では、運動鍛練者と非鍛練者の両方で30分程度で疲労困憊に至る漸増負荷運動は、尿中8-OHdG排泄量に影響しないことを認めた。そこで、より長時間の運動の影響を20 km ランニングにおいて検討した。

研究方法 (Fig. 2-3-1)

対象；50～100 km/週のトレーニングをおこなっている大学陸上競技部の長距離選手11名とした。対象者は、年齢 19.1 ± 0.2 才、身長 170.6 ± 1.1 cm、体重 59.3 ± 1.6 kg、最大酸素摂取量は 57.5 ± 1.9 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動負荷および採尿方法；運動は20 kmのタイムトライアルとした。運動前の3日間と運動後の3日間、24時間ごとの全尿を採取した。ただし、運動の直前と直後に完全排尿させた。対象者にはHeart rate monitor (Polar Vantage XL、キャノン、東京) を装着させ20 km ランニング中の心拍数を測定し、ランニング中の酸素摂取量を、実験室での対象者の最大酸素摂取量測定時の心拍数と酸素摂取量のデータを用いて算出した

分析；尿中8-OHdG濃度を、第2章第2節に記述したHPLC-ECD法で分析した。クレアチニン濃度はクリニメイトCREキット（第一化学）で定量した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。P<0.05 を有意とした。

研究結果

運動負荷

ランニング時間は 79.21 ± 2.39 分で、ランニング中の体重当たりの総酸素摂取量は 4.04 ± 0.13 l/kg であった。

Subjects; 11 long-distance runners

Exercise; 20 km running

Urine collection

Before exercise			After exercise		
Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3

Fig 2-3-1 Outline of experimental protocol

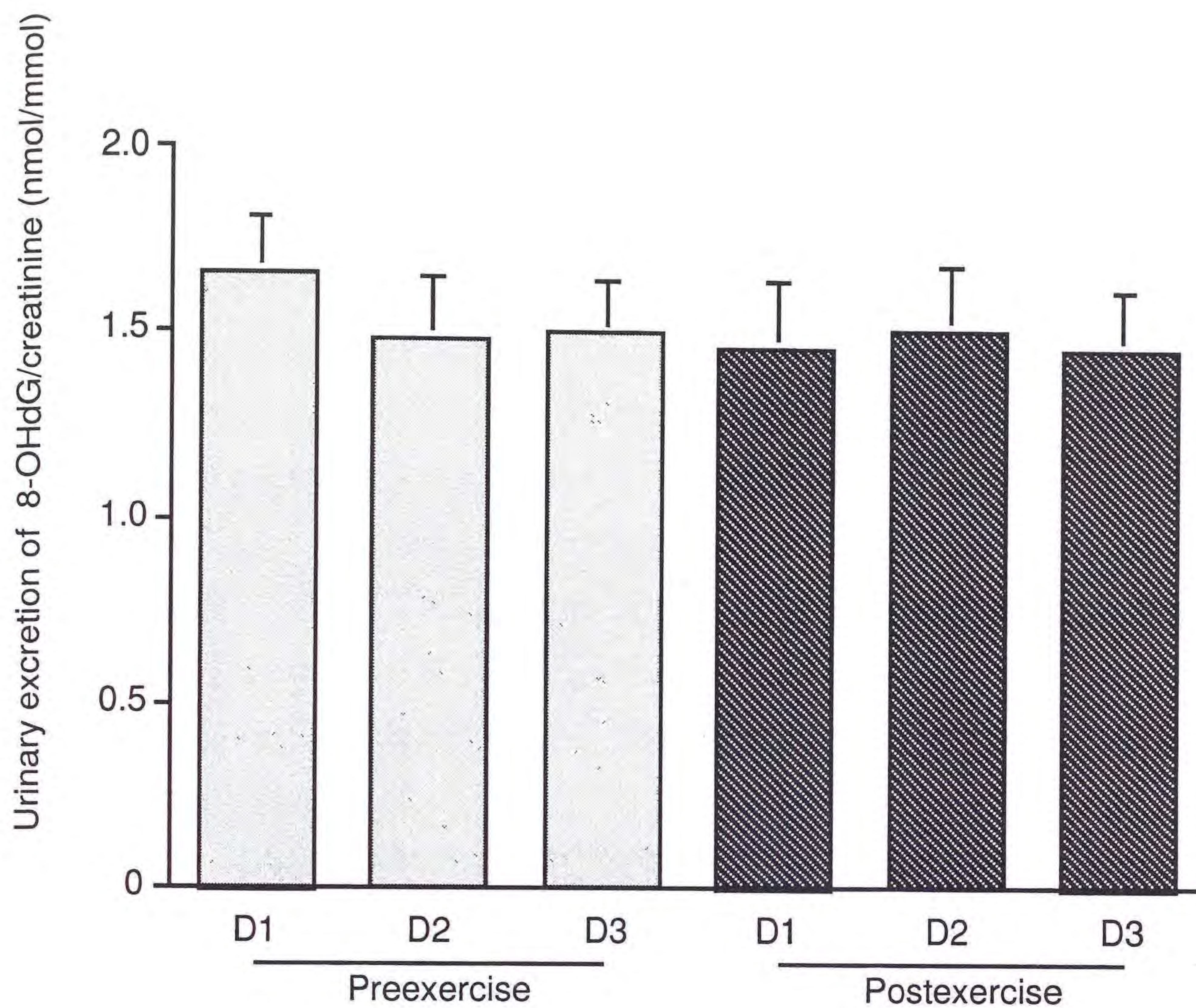


Fig. 2-3-2 Urinary excretion of 8-OHdG/creatinine from 3 days before a 20 km run until 3 days postexercise in runners. Values are the means \pm SE for 11 runners.

尿中 8-OHdG 排泄量 (Fig. 2-3-2)

運動 72 時間後まで尿中 8-OHdG 排泄量に変化は認められなかった。

考察

尿中 8-OHdG 排泄量は酸素摂取量に依存して増加すると報告されているので^{54, 55, 107)}、第 3 節では、本章第 2 節での運動よりも運動時間が長く酸素摂取量の多い運動で、尿中 8-OHdG 排泄に及ぼす運動の影響を検討した。本研究における 20 km ランニングでの酸素摂取量は $4.04 \text{ l/kg} \times 59.3 \text{ kg} = 240 \text{ l}$ と算出される。また、本研究での 20km ランニングが約 80 分の運動だったのに対して、本章第 2 節で検討した一過性に疲労困憊に至る運動の時間は約 30 分だった。したがって、運動による酸素消費量は、本研究の方が、第 2 節での運動よりも 2 倍程度多かったものと考えられる。しかし、運動による酸素摂取量を 2 倍程度に増大しても、尿中 8-OHdG 排泄量は増加しなかった。

本研究で尿中 8-OHdG 排泄が増加しなかったのが、対象者が鍛練者であったためで、非鍛練者であれば増加していた可能性が考えられる。すなわち、DNA の酸化的損傷に対する鍛練度の影響は不明だが、活性酸素種を消去する酵素系の防御能はトレーニングによって高まることが知られている^{26, 29, 60)}。対象者と年齢、体格が同等のヒトの一日あたりの酸素消費量を 2500 kcal/day、5 kcal/l oxygen として試算するとおよそ 500 l となる。したがって、普段運動していないヒトが 20 km ランニングをおこなうと、一日あたりの酸素摂取量は 50% 近く増大することになる。本研究における対象者は、一週間あたり 50~100 km のランニングをおこなっており、20 km ランニングはタイムトライアルだったとはいえ、非鍛練者が運動した場合に比べれば、実験日の酸素消費量が普段にくらべて極端に増大したとはいえないのかもしれない。しかしながら、非鍛練者がタイムトライアルで 20 km を走行することはほとんど不可能であり、非鍛練者での検討は現実には不可能と考えられる。

要約

鍛練者を対象に、長時間の持続的な運動が DNA の酸化的損傷を引き起こすかど

うかを、尿中 8-OHdG 排泄量を指標として 20 km ランニングにおいて検討した。その結果、尿中 8-OHdG 排泄量は運動の 3 日後まで変化せず、鍛練者においては 20km ランニングで DNA の酸化的損傷は起きないことが示唆された。

第4節 激運動の反復（合宿）

高強度かつ長時間の運動を反復することが尿中 8-OHdG 排泄量に及ぼす影響を、陸上長距離選手の合宿で検討した。

研究方法

対象；大学陸上部の男子長距離選手 10 名を対象とした。対象者は年令 20.1 ± 1.4 才、身長 168.9 ± 5.1 cm、体重 56.8 ± 3.2 kg だった。対象者には実験に先立って、実験目的を説明し同意書を得た。

運動；夏におこなわれた強化合宿を研究対象とした。合宿中の運動は早朝と夕方のランニングと午前中のウエイト・トレーニングおよびジョギングであった。一日あたりの平均走行距離は 30 km だった。

採尿および採血；対照として合宿に入る前の 3 日間の全尿を採取した。合宿期間中はすべての尿を採取した。尿量を測定し分析まで凍結保存した。採血は合宿開始日と終了日の翌日に、一夜絶食状態でおこなった。

分析；尿中 8-OHdG 濃度を、第 2 章第 2 節に記述した HPLC-ECD 法で測定した。リンパ球 8-OHdG/dG 比は、第 2 章第 1 節に記述した方法で分析した。

統計処理；対応のある t 検定を用いた。P<0.05 を有意とした。

研究結果

尿中 8-OHdG 排泄量 (Fig. 2-4-1)

尿中 8-OHdG 排泄量は合宿中で対照期にくらべて増加し、平均排泄量は対照期の 265.7 ± 75.5 pmol/kg/day に対して、合宿中が 335.6 ± 107.4 pmol/kg/day で有意に高かった。

リンパ球 DNA 中 8-OHdG/dG (Fig. 2-4-2)

研究期間を通じて変化は認められなかった。

考察

連日、平均 30 km ものランニング運動をおこなうと尿中 8-OHdG 排泄が増加したことから、DNA の酸化的損傷が起きたことが認められた。第 2 節の 30 分程度で一過性に疲労困憊に至る運動および第 3 節の 20 km ランニングでは運動後に尿中 8-OHdG 排泄が増加しなかったことと考え合わせると、運動による DNA の酸化的損傷は運動強度および時間に依存していることが示唆された。

これまで尿中 8-OHdG を指標とした、DNA の酸化的損傷に対する運動の影響については、運動後の一時点で採尿した部分尿を用いた研究で、マラソンの 10 時間後に 8-OHdG/クレアチニン比が 130% 上昇したことが報告されている¹⁰⁶⁾。また、通常のトレーニング後では有意な変化はなかったことが報告されている¹⁰⁴⁾。一方、日常的にランニングをおこなっている長距離ランナーの尿中 8-OHdG 排泄量は、運動習慣のない人と差がないとの報告がある¹¹¹⁾。本研究は運動前後の全尿を用いて、運動によって尿中 8-OHdG 排泄が増加することを認めた初めての研究である。

合宿 8 日目の 8-OHdG 排泄量は、合宿中の他の日にくらべて少なく対照期と同程度だった。これには 8 日目の午後の練習が悪天候のためキャンセルされ、この日の運動量が少なかったことが影響したと推測される。

一般のヒトの尿中 8-OHdG 排泄量は 200~300 pmol/kg/day である¹¹²⁾。本研究では、対照期が 265.7 ± 75.5 pmol/kg/day でこの範囲内にあったが、合宿中は 335.6 ± 107.4 pmol/kg/day でやや多かった。

合宿中に尿中 8-OHdG 排泄量が増加していたことから、合宿後にはリンパ球の DNA 中 8-OHdG 含量は減少していることが予想された。しかし、リンパ球の DNA 中 8-OHdG 含量は合宿前後で変化していなかった。本章第 1 節で観察したように、運動直後には DNA 中の 8-OHdG は増加せず、むしろ減少した。また、水泳および陸上競技の練習後に、リンパ球の DNA 中 8-OHdG 含量が減少したことが報告されている¹⁰⁴⁾。したがって、本研究の合宿でも毎日のトレーニングの後には

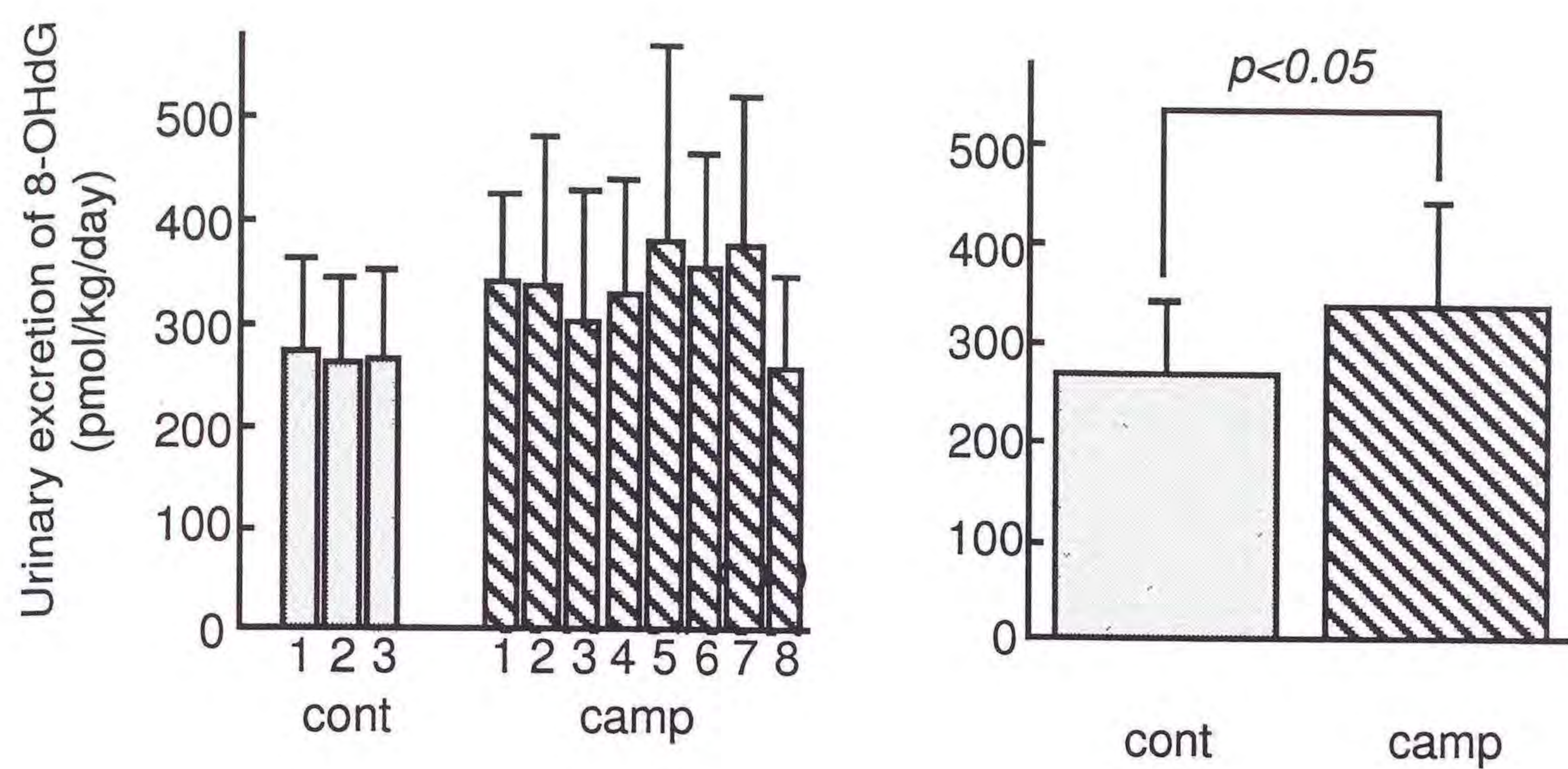


Fig. 2-4-1 Urinary excretion of 8-OHdG in the control period and the camp period.

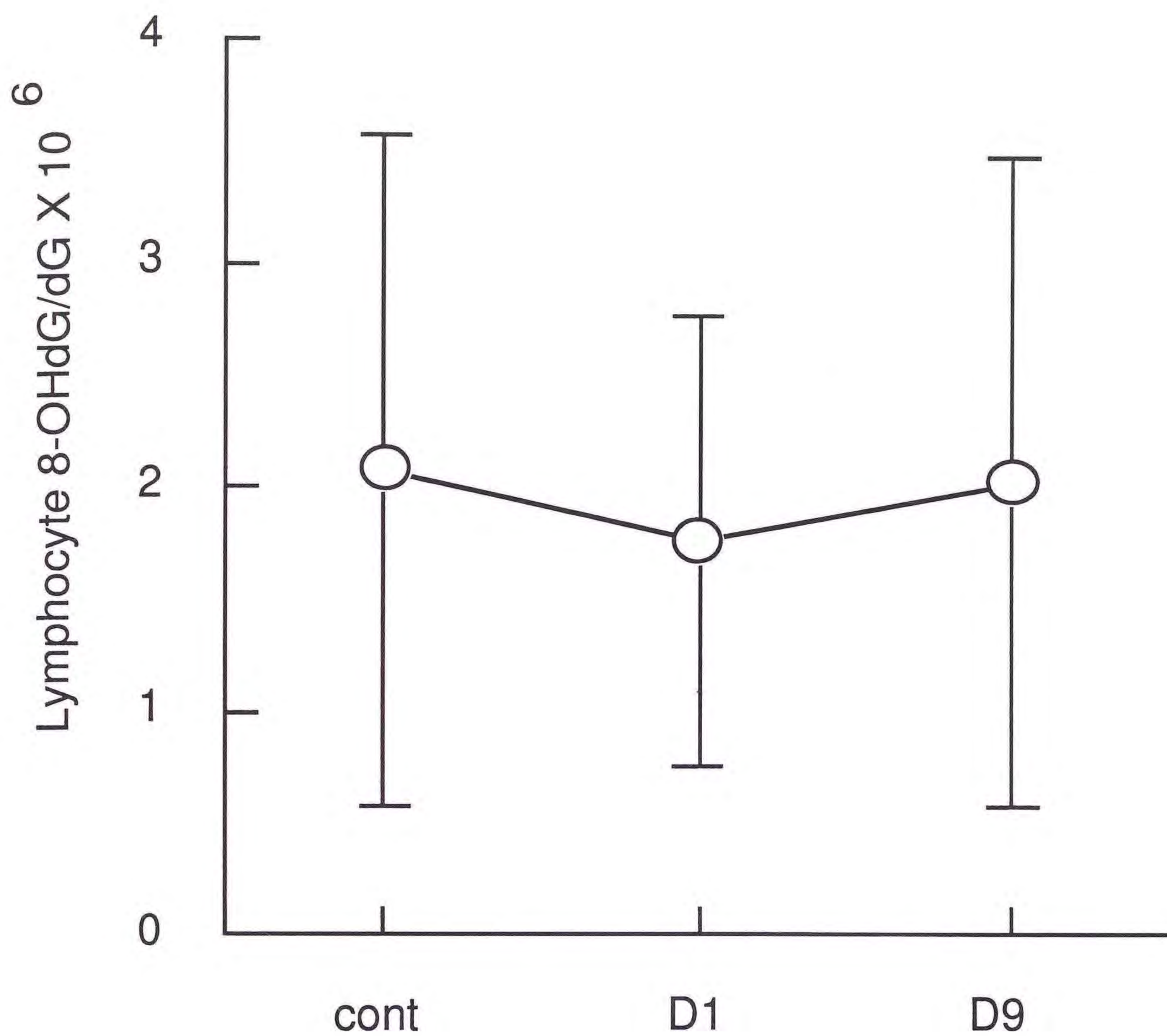


Fig. 2-4-2 Changes in lymphocyte 8-OHdG during the training camp. Means \pm SD for 10 subjects.

DNA 中 8-OHdG 含量が減少していたと推測される。そして、この除去された 8-OHdG が尿中に排泄されたために尿中排泄量が合宿中を通じて増大したものと推測される。

合宿後のリンパ球は、最後のトレーニングから約 24 時間後に採取された。もし合宿中の運動後に採取していたら、リンパ球 DNA 中の 8-OHdG 含量は減少していたと推測される。そして、本研究の合宿前後でリンパ球 DNA 中の 8-OHdG に変化が認められなかったことは、運動後、翌朝の採血までの間に 8-OHdG の生成が増加したことを示唆している。このように、合宿期間中は 8-OHdG の生成が増加したが、それに見合って除去が亢進したことによって、8-OHdG が DNA に蓄積しなかったと推察される。

8-OHdG を含む DNA は遺伝子変異の頻度を増加させる¹¹³⁾。また、放射線、過酸化水素、アスベスト、ディーゼル微粒子、ニッケル化合物などが 8-OHdG の生成を増加することが報告されている^{44, 45, 114, 115)}。動物を用いた発癌実験^{47, 116, 117, 118, 119, 120)} およびヒトの癌組織¹²¹⁾ において、8-OHdG が正常組織よりも増加していることが報告されている。したがって、8-OHdG の生成が増加することのある運動時に、DNA からの 8-OHdG の除去が亢進することは、8-OHdG が DNA に蓄積するのを防ぐ、生体に備わった防御機構と考えられる。

尿中 8-OHdG は、DNA から除去されたもの以外に、DNA に取り込まれる前の deoxyguanosine triphosphate (deoxyGTP) のプールからのものが含まれている¹²²⁾。本研究で尿中に排泄された 8-OHdG がどちらのプールからのものかは不明である。しかし、DNA 中のものにしろ deoxyGTP からのものにしろ、8-OHdG が除去されることは生体にとっては重要と考えられる。

要約

高強度かつ長時間の運動を反復することが、尿中 8-OHdG 排泄量に及ぼす影響を、陸上長距離選手の合宿で検討した。合宿前の 3 日間と 8 日間の合宿の全尿を採取し、8-OHdG 排泄量を測定した。合宿中の一日の平均走行距離は 30 km だった。

その結果、尿中 8-OHdG 排泄量は合宿中で合宿前にくらべて有意に増加した。このことから、強度が高く時間の長い運動は DNA の酸化的損傷を引き起こすことが示唆された。

第3章 β -カロテン補給の効果

第1節 漸増負荷運動に対する影響（単回摂取）

一過性に疲労困憊に至る運動の前に、 β -カロテンを補給することが運動による組織傷害および血漿抗酸化ビタミン濃度の変化に及ぼす影響を検討した。

研究方法（Fig. 3-1-1）

対象；大学陸上部に所属する男子長距離選手 18 名を対象者とした。対象者には実験に先立って、実験目的および想定される利益ならびに危険性を説明し、同意書を得た。

実験群；対象者は運動直前に、 β -カロテンを含む飲料を 480 ml 摂取する β -カロテン群（B 群）9 名と、 β -カロテンを含まない飲料を摂取する対照群（C 群）9 名に分けた。 β -カロテンを含む飲料の、 β -カロテン含有量は 0.6 mg/100ml であったので、 β -カロテン摂取量は 2.9 mg だった。B 群は、年齢 19.7 ± 1.1 才、身長 171.4 ± 6.2 cm、体重 58.5 ± 5.4 kg、最大酸素摂取量 54.3 ± 9.1 ml/kg/min、C 群は、年齢 19.0 ± 1.0 才、身長 168.3 ± 5.4 cm、体重 58.9 ± 3.9 kg、最大酸素摂取量 56.3 ± 6.7 ml/kg/min であった。

運動負荷方法；自転車エルゴメーターを用い、60% VO_2max で 60 分間運動した後、0.5 kp/min の漸増負荷で疲労困憊までおこなわせた。

採血；採血を被験飲料摂取前と疲労困憊時におこなった。

測定項目；血漿 β -カロテン（HPLC 法）、 α -トコフェロール（HPLC 法）、LDH（LDH-HR、和光純薬工業株）、CK（メルクオート CK、関東化学）、ミオグロビン（ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ研究所）濃度を測定した。

統計処理；群間の比較は対応のない t 検定でおこなった。運動前後の比較には対応のある t 検定を用いた。P<0.05 を有意とした。

Subjects; 18 long distance runners (9 controls and 9 β -carotene)

Beverage; control (C group); beverage C 480 ml

β -carotene(B group); beverage E 480 ml (β -carotene 2.9 mg)

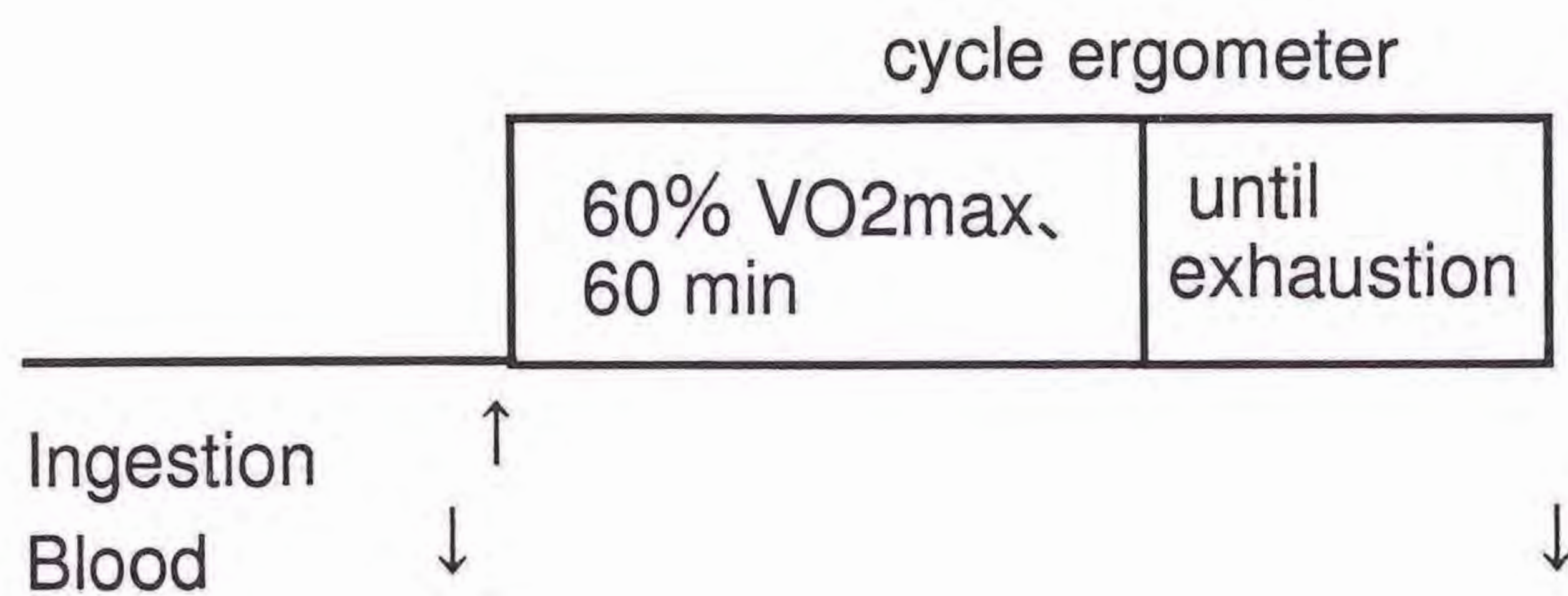


Fig. 3-1-1 Experimental protocol

研究結果

血漿 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度 (Fig. 3-1-2)

血漿 β -カロテン濃度には、運動前後ともに群間に差は認められなかった。血漿 β -カロテン濃度は、有意ではないが、運動後に低下する傾向があった。

血漿 α -トコフェロール濃度にも運動前後で群間に差は認められなかった。血漿 α -トコフェロール濃度は両群で、有意ではないが、運動後に上昇する傾向があった。

血清 LDH、ミオグロビンおよび CK 濃度 (Fig. 3-1-3)

血清 LDH と CK が運動後に有意に上昇した。しかし、群間に差は認められなかった。血清ミオグロビンには運動の影響も群間の差も認められなかった。

考察

本研究では、運動直前に β -カロテンを 2.9 mg 摂取させたが、運動開始時および終了時に、血漿 β -カロテン濃度には B 群と C 群とで差がなかった。

血漿 β -カロテン濃度は、12 mg あるいは 30 mg を摂取したとき、摂取の 8 時間後に摂取前値にくらべて有意に上昇し、最高値は 24~48 時間後であると報告されている¹²³⁾。そして、摂取前からの上昇程度は 12 mg 摂取したときには $17.7 \mu\text{g/dl}$ 、30 mg 摂取したときには $28.9 \mu\text{g/dl}$ であった¹²³⁾。また、25 mg の β -カロテンを摂取したときには、摂取前の $37 \mu\text{g/dl}$ から摂取 8 時間後に $51 \mu\text{g/dl}$ へ上昇したことが報告されている¹²⁴⁾。さらに、高齢者 (73 ± 4 才) と若年者 (24 ± 1 才) に 15 mg の β -カロテンを摂取させた研究で、摂取後の血中濃度の応答は若年者の方が高かったが、摂取 3 時間後までは上昇せず、4 時間後でわずかに上昇し、最高値は 5 時間後だったことが観察されている¹²⁵⁾。

本研究では飲料摂取前の血漿 β -カロテン濃度を測定していないので断定はできない。しかし、 β -カロテンを摂取した直後の運動前の採血でも運動後の採血においても、B 群と C 群とで差がなかったことから、本研究での投与量ならびに投与後の時間内には血漿 β -カロテン濃度は上昇しなかったと考えられた。

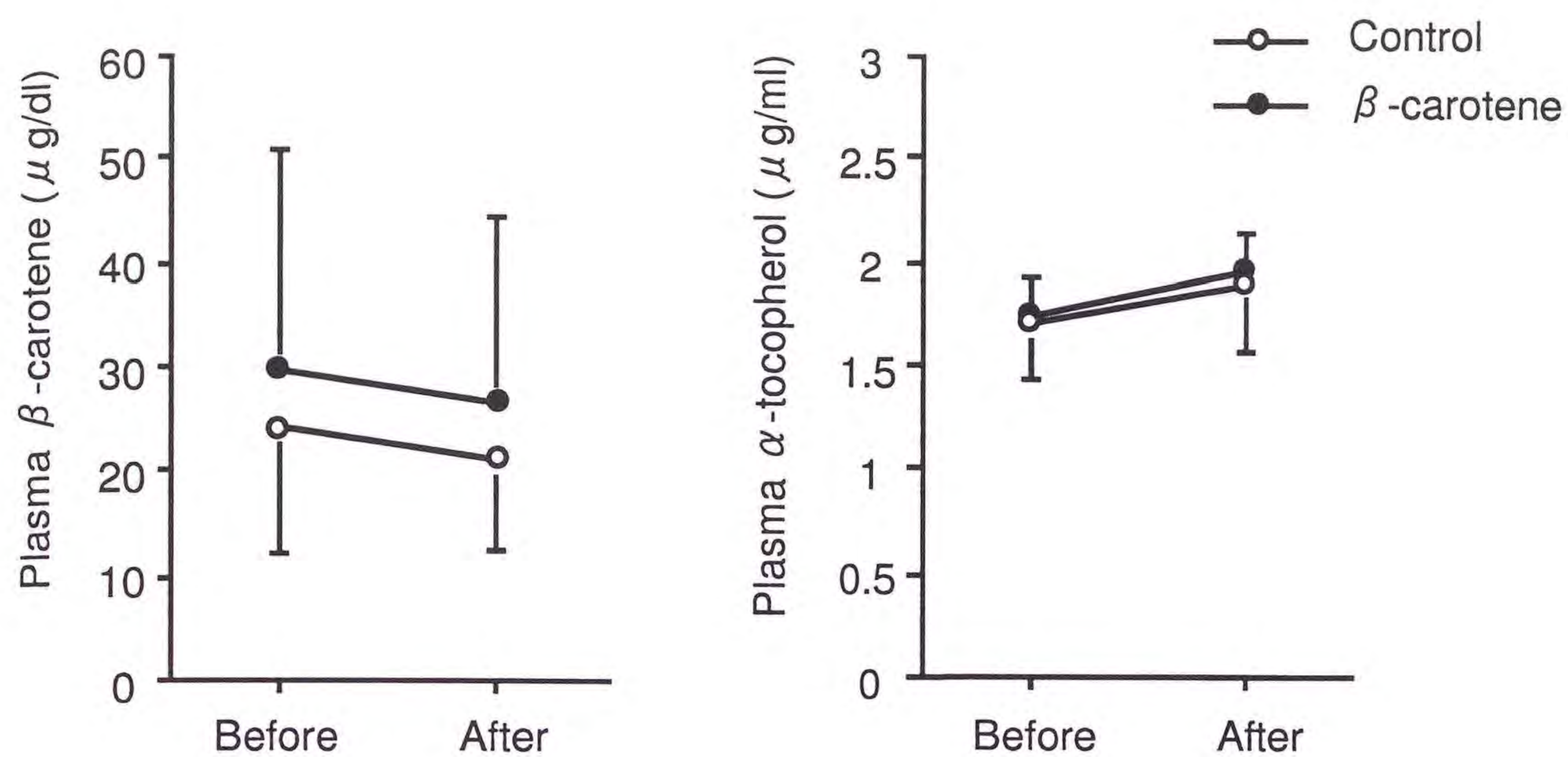


Fig. 3-1-2 Effect of 2.9 mg β -carotene ingestion immediately before exercise on exercise-induced changes in plasma β -carotene and α -tocopherol. Means \pm SD. Control, n=9; β -carotene, n=9.

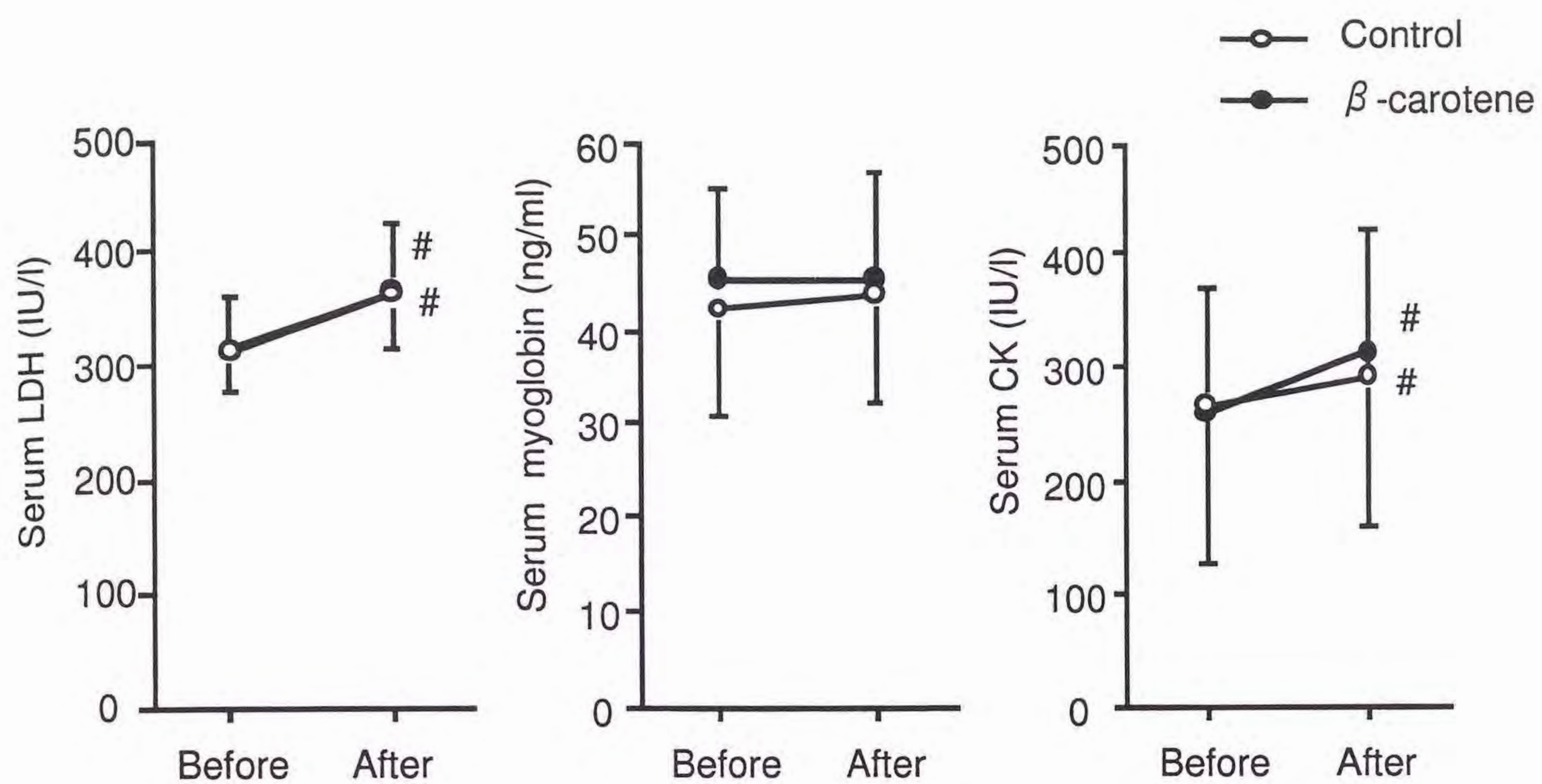


Fig. 3-1-3 Effect of 2.9 mg β -carotene ingestion immediately before exercise on exercise-induced changes in serum LDH, myoglobin, and CK. Means \pm SD. Control, n=9; β -carotene, n=9. # P<0.05 vs before.

β -カロテン摂取後に血漿濃度は上昇しなかったが、吸収され組織に取り込まれていたかどうかは不明である。しかし、本研究では、血清 LDH および CK レベルが運動後に B 群と C 群とで同じように上昇していた。このことは、本研究での投与量および実験条件では、 β -カロテンは運動時の組織損傷に影響しないと考えられた。

要約

一過性に疲労困憊に至る運動の前に、 β -カロテンを補給することが運動による組織損傷および抗酸化ビタミンの変化に対する影響を検討した。その結果、運動後の血清 CK、LDH の上昇には β -カロテン群と対照群とで差がなかった。また、血中 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度にも群間に差がなかった。以上の結果から、運動直前に β -カロテンを補給しても、血中 β -カロテン濃度は上昇せず、運動による組織損傷にも影響しないことが示唆された。

第2節 漸増負荷運動に対する影響（3週間摂取）

β -カロテンを継続摂取することによって、血漿 β -カロテン濃度を高く維持しておくことが、運動による組織傷害および血漿抗酸化ビタミン濃度の変化に及ぼす影響を検討した。

研究方法（Fig. 3-2-1）

対象；大学陸上部に所属する男子長距離選手 18 名を対象者とした。対象者には実験に先立って、実験目的および想定される利益ならびに危険性を説明し、同意書を得た。

実験群；対象者を 3 週間、 β -カロテンを 0.6 mg/100ml 含む飲料を摂取する B 群 9 名と、 β -カロテンを含まない飲料を摂取する C 群 9 名に分けた。飲料の摂取量は自由とし、毎日摂取量を記録した。B 群は、年齢 19.7 ± 1.1 才、身長 171.4 ± 6.2 cm、体重 58.5 ± 5.4 kg、最大酸素摂取量 54.3 ± 9.1 ml/kg/min、C 群は、年齢 19.0 ± 1.0 才、身長 168.3 ± 5.4 cm、体重 58.9 ± 3.9 kg、最大酸素摂取量 56.3 ± 6.7 ml/kg/min であった。

運動負荷方法；3 週間の摂取期間後に運動負荷実験をおこなった。運動には自転車エルゴメーターを用い、60% VO_{2max} で 60 分間運動した後、0.5 kp/min の漸増負荷で疲労困憊までおこなわせた。

採血；採血を運動前と疲労困憊時におこなった。

測定項目；血漿 β -カロテン（HPLC 法）、 α -トコフェロール（HPLC 法）、LDH（LDH-HR、和光純薬工業株）、CK（メルクオート CK、関東化学）、ミオグロビン（ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ研究所）の濃度を測定した。

統計処理；群間の比較は対応のない t 検定でおこなった。運動前後の比較には対応のある t 検定を用いた。P<0.05 を有意とした。

Subjects; 18 long distance runners (9 controls and 9 β -carotene)

Beverage; control (C group); beverage C
β-carotene(B group); beverage B

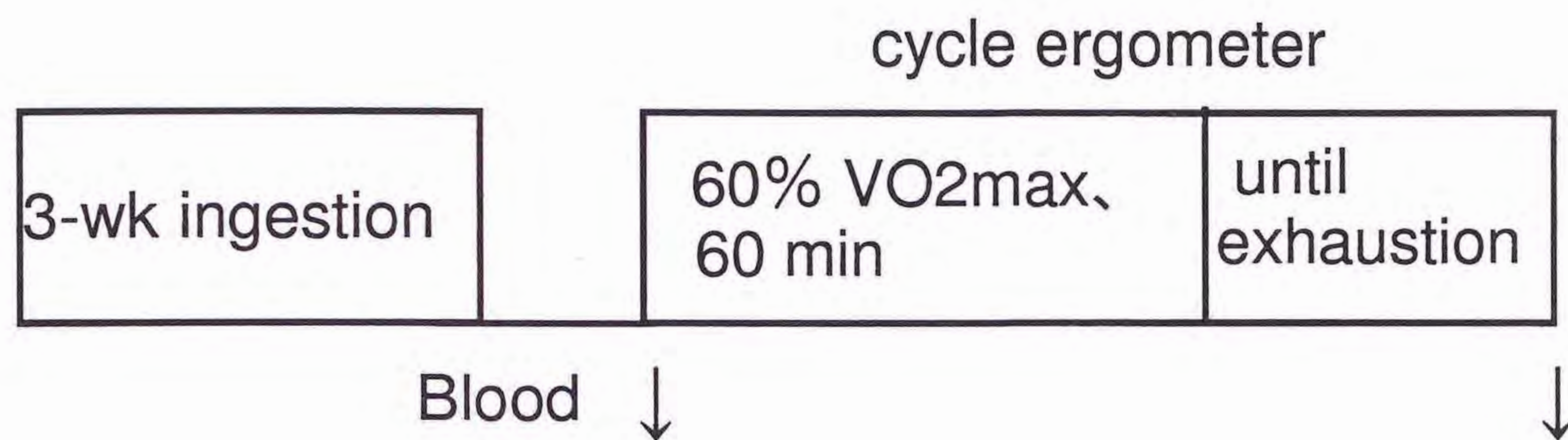


Fig. 3-2-1 Experimental protocol

研究結果

β -カロテン摂取量

3 週間の飲料の平均摂取量は 503 ml/ day であったので、飲料からの β -カロテン摂取量は 3.0 mg/day であった。

血漿 β -カロテンおよび α -トコフェロール濃度 (Fig. 3-2-2)

運動前の血漿 β -カロテン濃度は、B 群が C 群よりも有意に高く、運動後にも有意に高かった。血漿 β -カロテン濃度は両群で、運動後に有意ではないが低下する傾向が認められた。血漿 α -トコフェロール濃度には、運動前後で群間に差は認められなかった。血漿 α -トコフェロール濃度は両群で、運動後に有意ではないが上昇する傾向が認められた。

血清 LDH、ミオグロビンおよび CK 濃度 (Fig. 3-2-3)

血清 LDH は運動前値が B 群で C 群よりも有意に低かった。血清 LDH は運動後に両群で有意に上昇し、運動後のレベルには群間で差は認められなかった。血清ミオグロビン濃度は、両群で運動による変化は認められなかったが、運動後の濃度は B 群が C 群よりも有意に低かった。運動前値も B 群の方が低値だったが、C 群のばらつきが大きく、有意な差はなかった。血清 CK は両群で運動後に有意に上昇したが、運動前後ともに群間に差は認められなかった。

3 週間の摂取期間後の血漿 β -カロテン濃度と血清 LDH 濃度との間に有意な負の相関関係を認めた (Fig. 3-2-4)。

考察

本研究で、B 群は 1 日平均 3.0mg の β -カロテンを 3 週間摂取した。3 週間後の血漿 β -カロテン濃度は B 群で 51 μ g/dl であり、C 群の 22 μ g/d よりも有意に高かった。

本研究で摂取した程度の量の β -カロテンを、長期間摂取したときの血中濃度の応

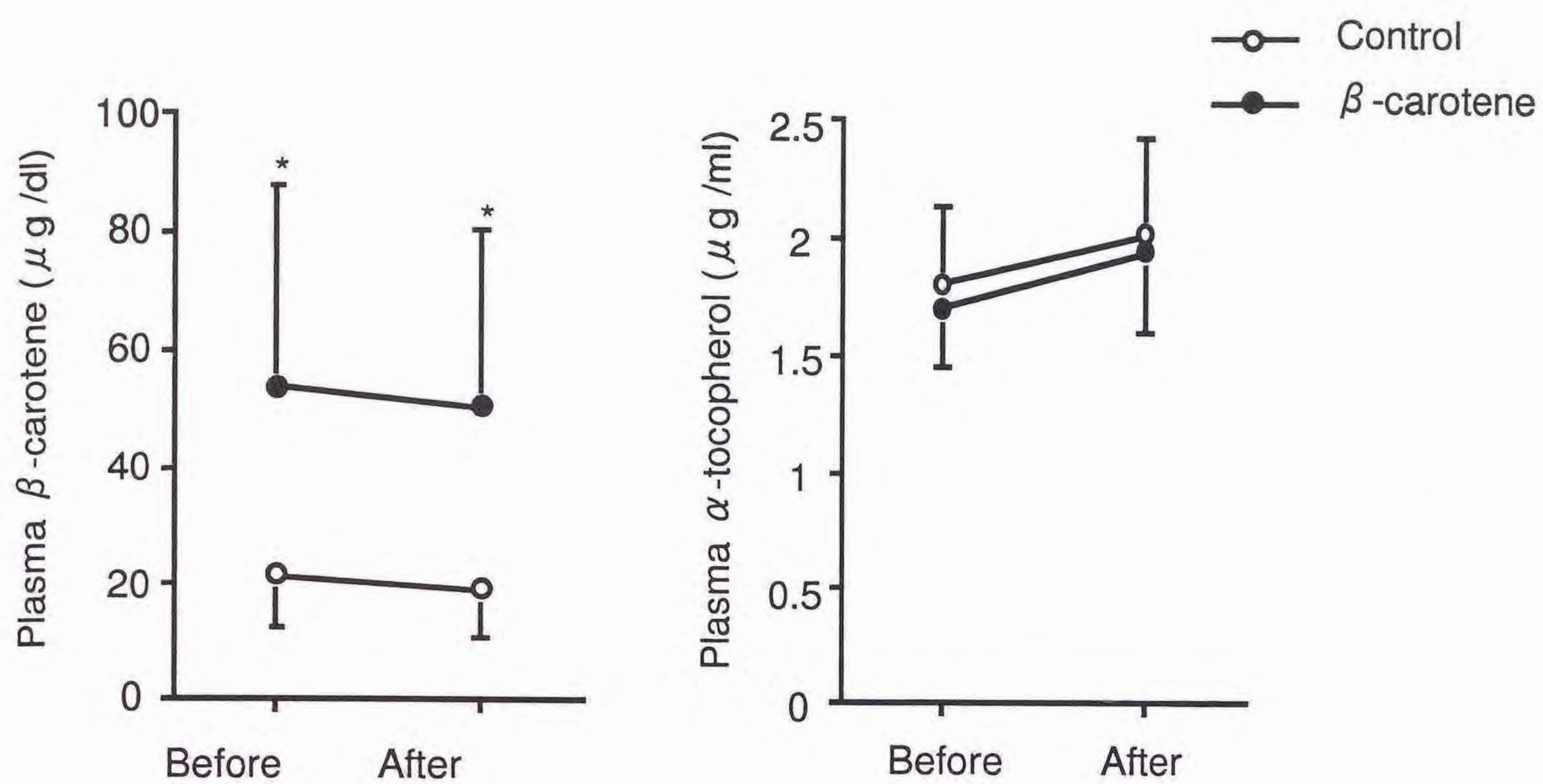


Fig. 3-2-2 Effect of 3-week ingestion of β -carotene on exercise-induced changes in plasma β -carotene and α -tocopherol. Means \pm SD for 9 subjects in each group. * $P < 0.05$ vs control.

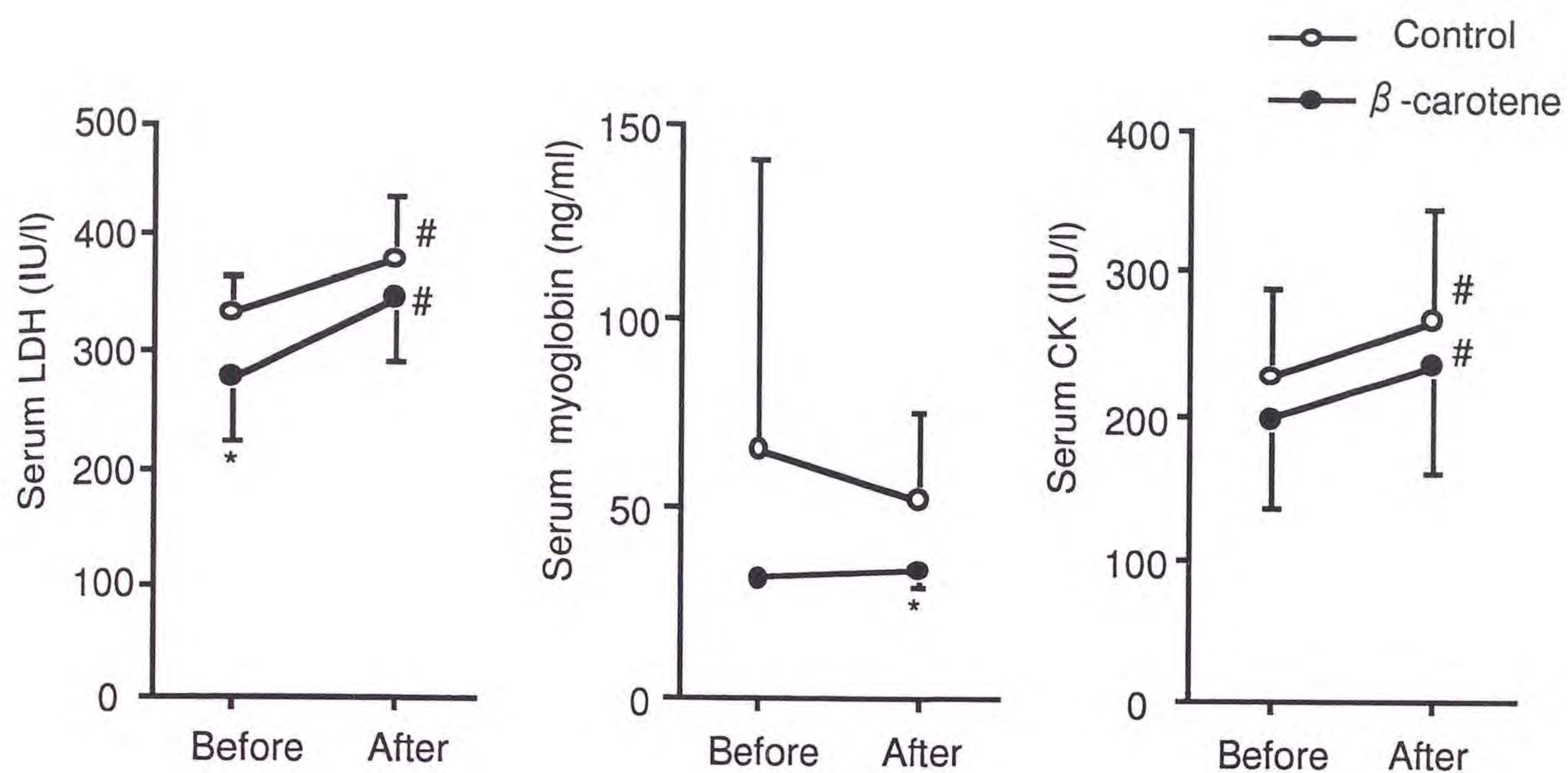


Fig. 3-2-3 Effect of 3-week ingestion of β -carotene on exercise-induced changes in serum LDH, myoglobin, and CK. Means \pm SD for 9 subjects in each group.
 * $P < 0.05$ vs control. # $P < 0.05$ vs before.

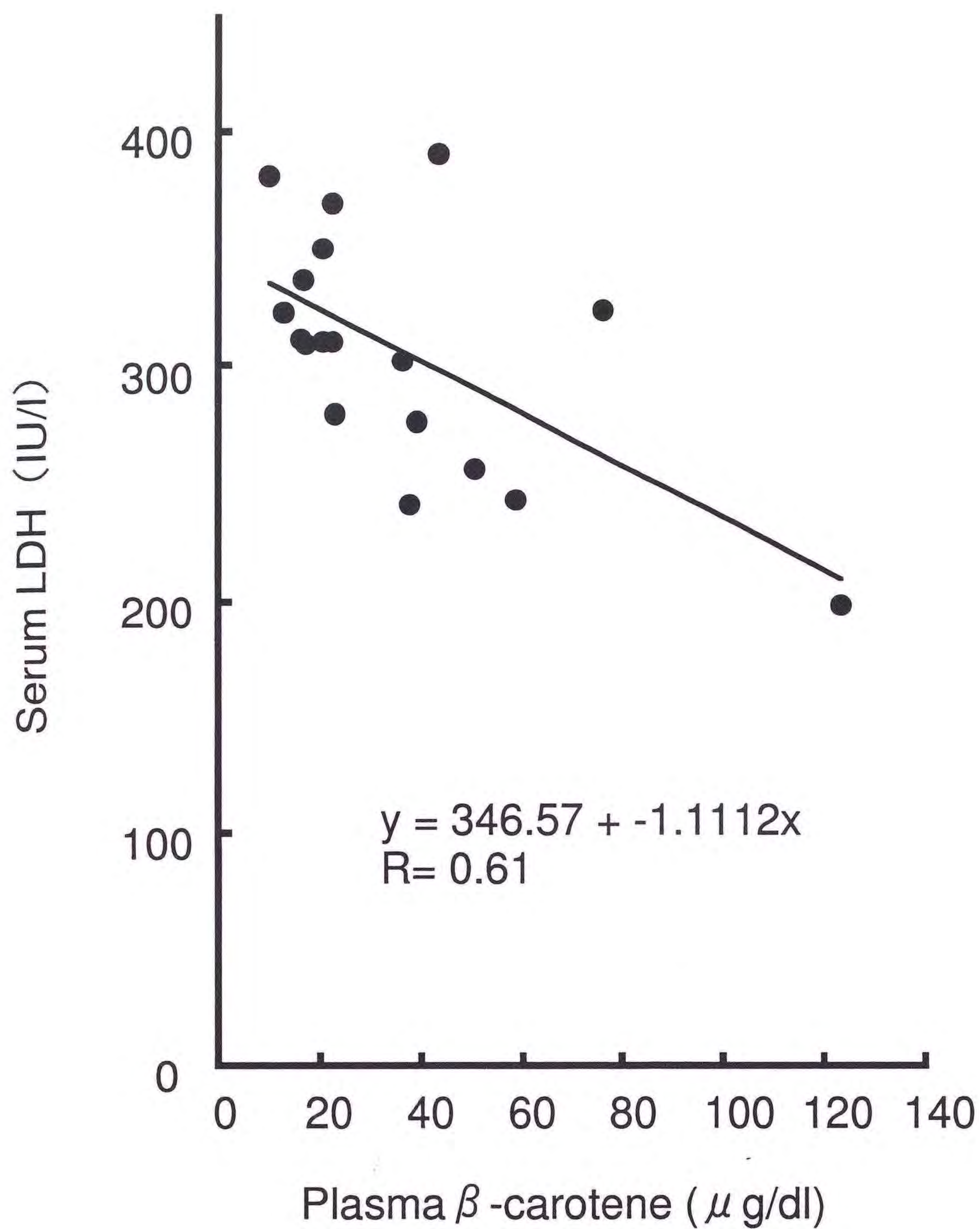


Fig. 3-2-4 Correlation between serum LDH and plasma β -carotene

答に関する報告はみあたらない。 β -カロテン 15 mg/day を 10 ヶ月間摂取すると、血中濃度が摂取前の $16 \mu\text{g/dl}$ から $172 \mu\text{g/dl}$ へ上昇したと報告されている¹²⁶⁾。その研究では、摂取を開始して 2 ヶ月後に $156 \mu\text{g/dl}$ に上昇し、4 ヶ月後および 7 ヶ月後には $177 \mu\text{g/dl}$ だった¹²⁶⁾。 β -カロテン 15 mg/day を 4 週間摂取させた研究では、血漿 β -カロテン濃度が $160 \mu\text{g/dl}$ に上昇したと報告されている¹²⁷⁾。これらの結果は、血漿 β -カロテン濃度が摂取量に依存して上昇することを示唆している。一方、15 mg の β -カロテンを摂取させた上述の二つの研究で、摂取を始めてから 2 ヶ月後の血漿濃度 ($156 \mu\text{g/dl}$)¹²⁶⁾ と、4 週間後の濃度 ($160 \mu\text{g/dl}$)¹²⁷⁾ が等しいことから、 β -カロテン摂取後に血漿濃度は 4 週間までにプラトーになることが示唆される。本研究では β -カロテンを 3 週間摂取させたので、 $50 \mu\text{g/dl}$ という血漿濃度が β -カロテン 3.0 mg/day を摂取したときの、ほぼ到達濃度だと考えられる。

血漿 β -カロテン濃度は、継続摂取して体内レベルを高めておいても、第 1 章で観察されたように運動後に低下する傾向を示した。本研究では β -カロテンの血漿濃度が上昇していたので、組織にも蓄積されていたと推測される。 β -カロテンは肝臓、副腎に高濃度に存在している^{83, 84, 85)}。フェレットに β -カロテンを 2 週間¹²⁸⁾あるいは 3 週間⁸⁵⁾投与した実験で、肝臓に最も多量に蓄積されることが示されている。その他の組織、たとえば副腎や脂肪組織の濃度も、 β -カロテンを投与することによって上昇する^{85, 128)}。副腎は運動時に血漿アスコルビン酸濃度を上昇させる動員部位であり、脂肪組織および肝臓は血漿 α -トコフェロール濃度を上昇させる動員部位と考えられている。もし、本研究で β -カロテンがこれらの組織に蓄積されていたのなら、運動時に血漿濃度が低下傾向を示したことは動員が起こらなかったためとは考えにくい。血漿濃度は、血漿からの消失速度が貯蔵部位からの動員速度を上回ったときに低下すると考えられるので、運動時には β -カロテンの消費が非常に早かった可能性が推測される。運動時に酸素消費量が増大する筋肉が、 β -カロテンを消費した部位だった可能性が考えられる。しかし、運動時に血漿 β -カロテン濃度が低下する理由については現時点では不明である。

本研究では、3 週間の摂取期間後の血清 LDH が B 群で C 群よりも有意に低く、血清ミオグロビン濃度が B 群で C 群よりも、有意ではないが低値だった。また、運

動負荷実験終了時の血清ミオグロビン濃度がB群でC群よりも有意に低かった。さらに、3週間の摂取期間後の血漿 β -カロテン濃度と血清LDHレベルとに負の相関関係が認められた。これらのことは、血漿 β -カロテン濃度を高く維持しておくこと、運動選手が日常的におこなっているトレーニングによる筋肉の酸化的損傷が低く抑えられる可能性を示唆している。

要約

3.0 mg/day の β -カロテンを3週間摂取させたときの、運動時の組織損傷に及ぼす影響を検討した。血漿 β -カロテン濃度は3週間の摂取によって対照群の約2.5倍に上昇した。

3週間の摂取期間後の血清LDHがB群でC群よりも有意に低く、血清ミオグロビン濃度がB群でC群よりも有意ではないが低値だった。また、運動負荷実験終了時の血清ミオグロビン濃度がB群でC群よりも有意に低かった。さらに、3週間の摂取期間後の血漿 β -カロテン濃度と血清LDHレベルとに負の相関関係が認められた。

これらの結果から、血漿 β -カロテン濃度を高く維持しておくことによって、運動選手が日常的におこなっている、トレーニングによる筋肉の酸化的損傷が低く抑えられる可能性が示唆された。

第3節 トライアスロンに対する影響

トライアスロン・レースに先だって β -カロテンを継続摂取させたときの、トライアスロンによる組織傷害の指標および血中抗酸化ビタミンの変化に及ぼす影響を検討した。

研究方法 (Fig. 3-3-1)

対象および実験群；成人男子トライアスロン選手 23 名を対象とし、レース前に β -カロテンを毎日摂取する β -カロテン群 (B 群) 6 名 (46 ± 8 才) と対照群 (C 群) 17 名に (33 ± 8 才) 分けた。B 群には β -カロテンを 0.6 mg/100ml 含む飲料を自由に摂取させ、摂取量を記録した。B 群の摂取期間は平均 15 日間 (10~20 日間) だった。対象者には、実験に先立って目的を説明し参加の同意を得た。

運動負荷および採血；研究対象としたトライアスロンは水泳 3.9 km、自転車 180 km、ランニング 42km からなる競技であった。採血は、競技の 2 日前の早朝空腹時、競技直後、競技翌日の早朝空腹時の 3 回おこなった。

測定項目；血漿 β -カロテン (HPLC 法)、アスコルビン酸 (HPLC 法)、CK (メルクオート CK、関東化学)、ミオグロビン (ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ研究所) の濃度を測定した。

統計処理；群間の比較は t-検定おこない、経時変化は Bonferroni test で検定した。 $P < 0.05$ を有意とした。

研究結果

β -カロテン摂取量

レース前の B 群の飲料の平均摂取量は 744 ± 255 ml/日であったので、飲料からの β -カロテン摂取量は 4.5 ± 1.5 mg/日であった。

血漿 β -カロテンおよびアスコルビン酸濃度 (Fig. 3-3-2)

Subjects; control 17, β -carotene 6

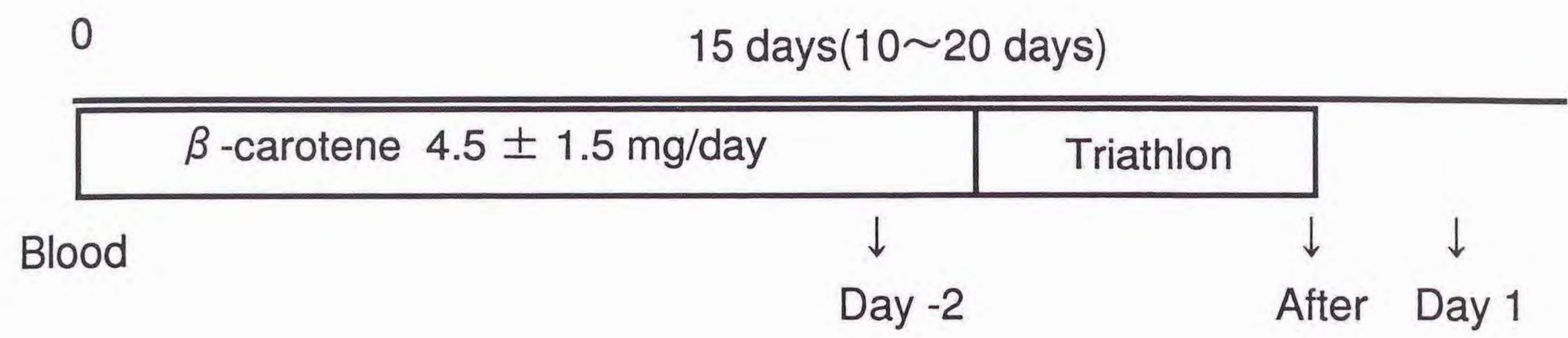


Fig. 3-3-1 Experimental protocol

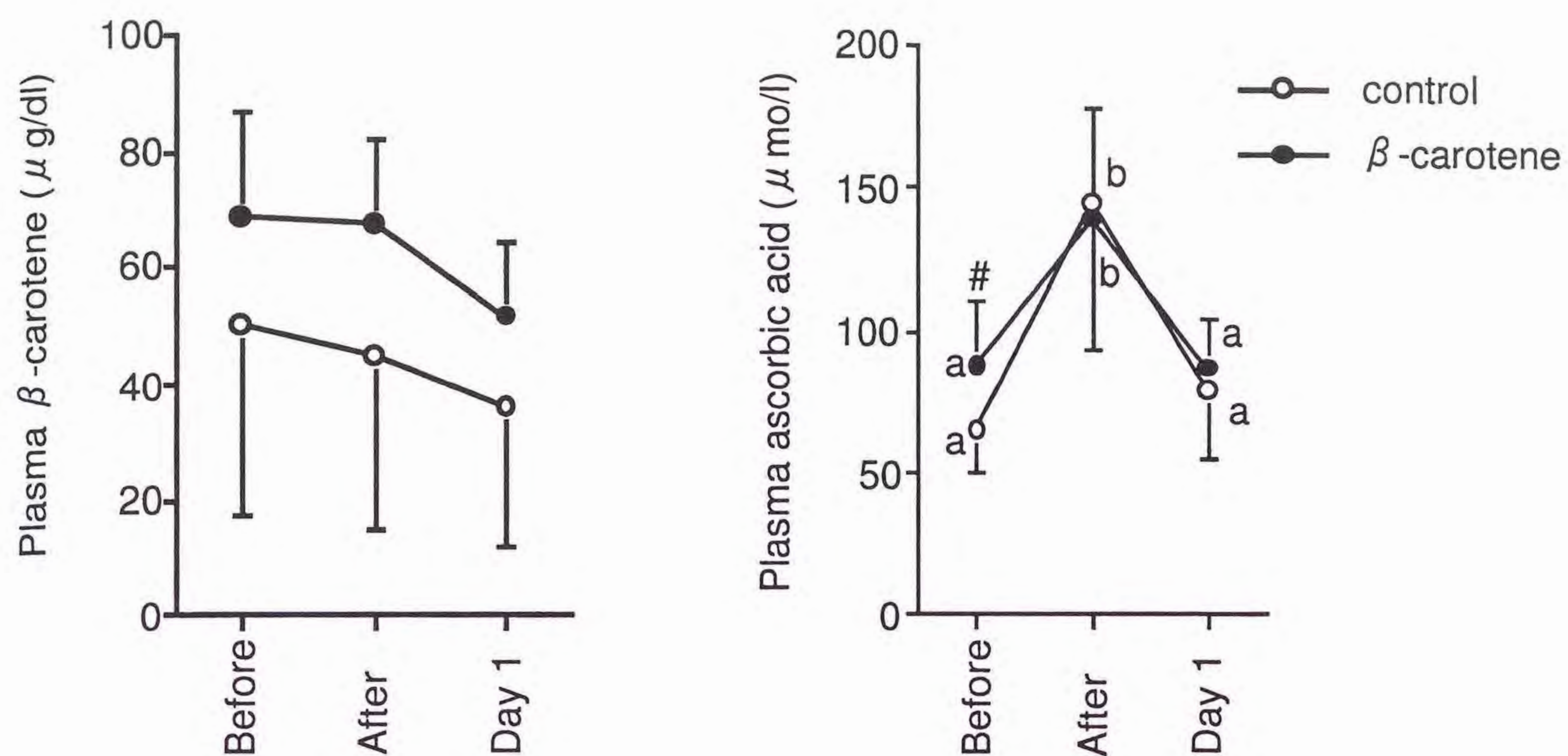


Fig. 3-3-2 Effect of β -carotene supplementation on changes in plasma β -carotene and ascorbic acid induced by triathlon. Means \pm SE. Control, n=17; β -carotene, n=6. # P<0.05 vs control. Values with different letters are significantly different.

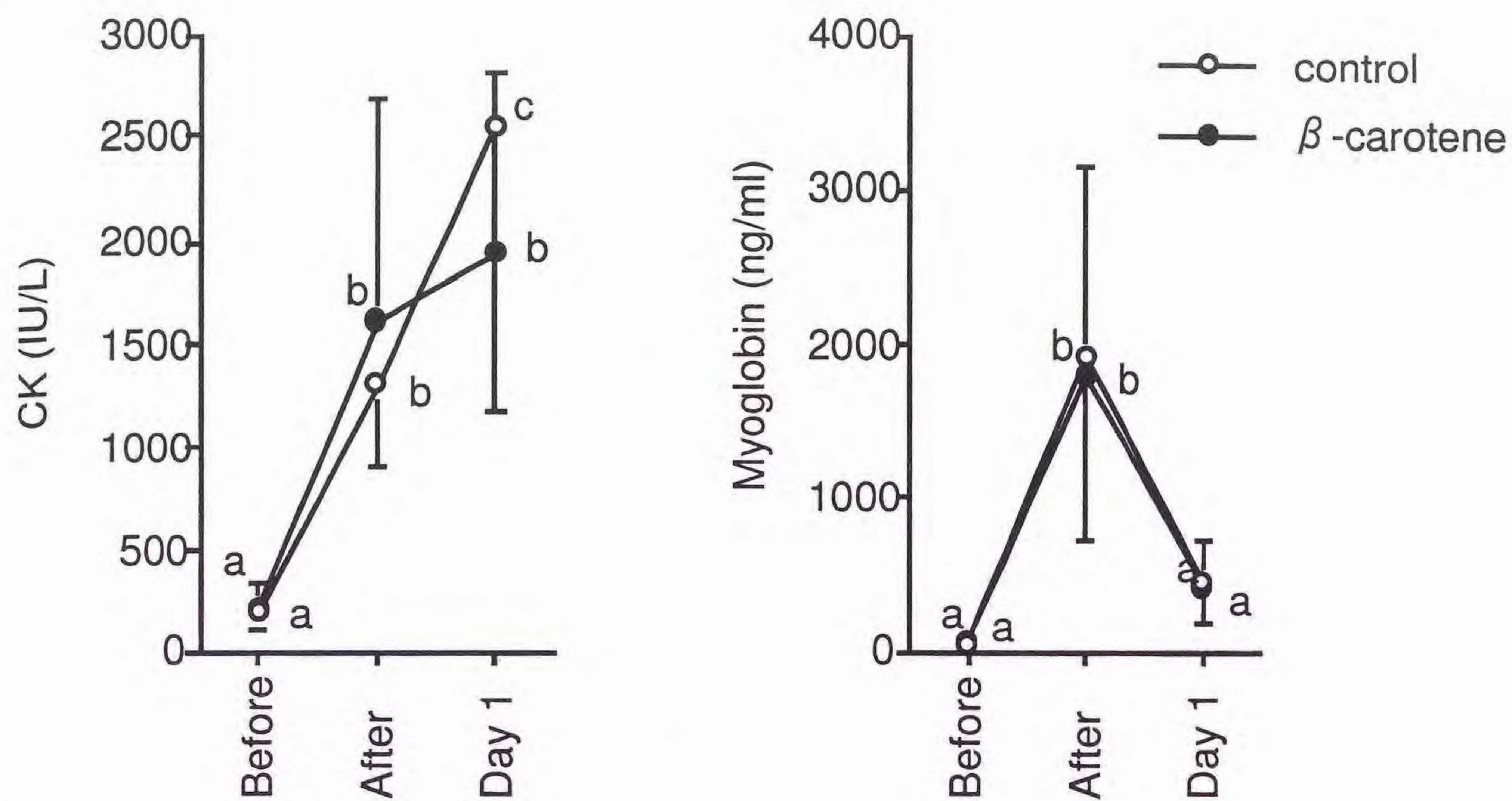


Fig. 3-3-3 Effect of β -carotene supplementation on changes in plasma CK and myoglobin induced by triathlon. Means \pm SE. Control, $n=17$; β -carotene, $n=6$. Values with different letters are significantly different.

血漿 β -カロテン濃度は、いずれの時点においてもB群がC群よりも有意ではないが高かった。血漿 β -カロテン濃度は、運動後は低下傾向にあり翌日はさらに低下する傾向にあった。血漿アスコルビン酸濃度は、両群ともに運動直後で運動前値にくらべ有意に上昇し、翌日には前値まで低下した。

血漿CKおよびミオグロビン濃度 (Fig. 3-3-3)

血漿CK濃度は運動後に有意に上昇し、C群では翌日にさらに上昇し、B群でも高値が持続した。血漿CK濃度には群間の差は認められなかった。血漿ミオグロビン濃度も運動直後で運動前値にくらべて有意に上昇したが翌日には低下した。血漿ミオグロビンには、群間に差は認められなかった。

考察

レース前の血漿 β -カロテン濃度は、一日あたり4.5 mgの β -カロテンを10~20日間摂取したB群でC群よりも高い傾向にあった。しかし、対照群との間に有意差はなかった。このことには、本研究の対照群の血漿 β -カロテン濃度(49 μ g/dl)が、今回の一連の研究での対照群の濃度のおよそ2.5倍程度と高かったことが影響している。本研究では食事調査をおこなっていないので断定できないが、トライアスロン選手は激しい運動をおこなうため、栄養に対する関心が一般に高く、日頃から緑黄色野菜などを多く摂取していたために、血漿 β -カロテン濃度が高かった可能性が考えられる。

血漿 β -カロテン濃度はレース後に減少傾向を示した。これはこれまでの一連の研究と共通した変化である。本研究ではレース前の血漿アスコルビン酸濃度が β -カロテン群で有意に高かった。このことは、 β -カロテンを補給することによって、アスコルビン酸の消費が節約されたことを示唆するものかもしれない。アスコルビン酸と α -トコフェロールには相互作用のあることが知られている。 β -カロテンと α -トコフェロールとは脂溶性の抗酸化物質だが、 β -カロテンにはアスコルビン酸との直接的な相互作用はないとの報告がある¹²⁹⁾。しかし、 β -カロテンによって α -トコフェロールの消費が減少すれば、 α -トコフェロールを再生するアスコルビン酸が節

約される可能性も考えられる¹²⁹⁾。

本章第2節では、血漿β-カロテン濃度を50 μg/dl程度に維持しておくこと、日常の運動による組織損傷を低減する可能性が示唆された。しかし本研究では、レース前の血漿β-カロテン濃度が、C群が49 μg/dl、B群が80 μg/dlだったが、トライアスロンの後の血漿CKおよびミオグロビンがB群とC群でともに上昇し、レースの直後および翌日において群間に差がなかった。これらの結果から、β-カロテンはトライアスロンという過激な運動による組織損傷は低減できなかったと結論される。

要約

トライアスロンに先だって4.5 mgのβ-カロテンを平均15日間摂取したときの、トライアスロンによる組織傷害および血漿抗酸化ビタミンの変化に及ぼす影響を検討した。β-カロテンを継続摂取することによって、血漿β-カロテン濃度は上昇したが、対照群の値が高かったために有意差には至らなかった。血漿アスコルビン酸濃度がβ-カロテン群で高かったことから、β-カロテンがアスコルビン酸の消費を節約した可能性が考えられた。トライアスロンによる組織損傷の指標には群間に差がなかったことから、β-カロテンはトライアスロンによって引き起こされる組織損傷を軽減しないことが認められた。

第4節 3.8 mg、4週間摂取の影響

日頃運動トレーニングをおこなっていて、酸化ストレスに曝される危険性の高いと考えられる運動選手に、実際的な摂取量の β -カロテンを4週間摂取させ、安静時の酸化ストレスの指標に対する影響を検討した。

研究方法 (Fig. 3-4-1)

対象；三つの大学の運動部に所属する97名（年齢 19.9 ± 1.4 才）を対象者とした。対象者は、大学Aで36名（柔道2、野球2、体操競技1、テニス2、クロスカントリー4、陸上競技5、バレーボール2、少林寺拳法1、サッカー9、バスケットボール8、すべて男子）、大学Bで33名（ヨット男子10、女子1、水泳男子20、女子2）および大学Cで28名（陸上競技男子13、女子5、バレーボール男子10）であった。対象者には実験に先だって実験の目的および方法を十分に説明し、実験に参加する同意書を得た。

β -カロテン摂取；対象者には β -カロテンを0.6 mg/100ml 含む飲料を4週間自由に摂取させた。摂取量は毎日、記録した。食事およびトレーニングには特別な規制は加えず、通常の食事および練習を継続するように依頼した。

採血；採血は摂取期間前、2週目および4週目の3回、一夜絶食状態でおこなった。3回の採血のうち1回でも朝食を摂取していた対象者7例は、データから除外した。

採尿；採尿に同意した59名を対象とし、24時間尿を摂取開始前に3日間、摂取期間終了直前に3日間それぞれ採取した。

測定項目；血漿 β -カロテン(HPLC法)と尿中8-OHdG(HPLC-ECD法)、TBARS（過酸化脂質テストワコー、和光純薬工業株）、クレアチニン（クレアチニン-HR、和光純薬工業株）を分析した。

統計処理；血漿 β -カロテンの変化は二元配置分散分析とSheffe testにより検定した。

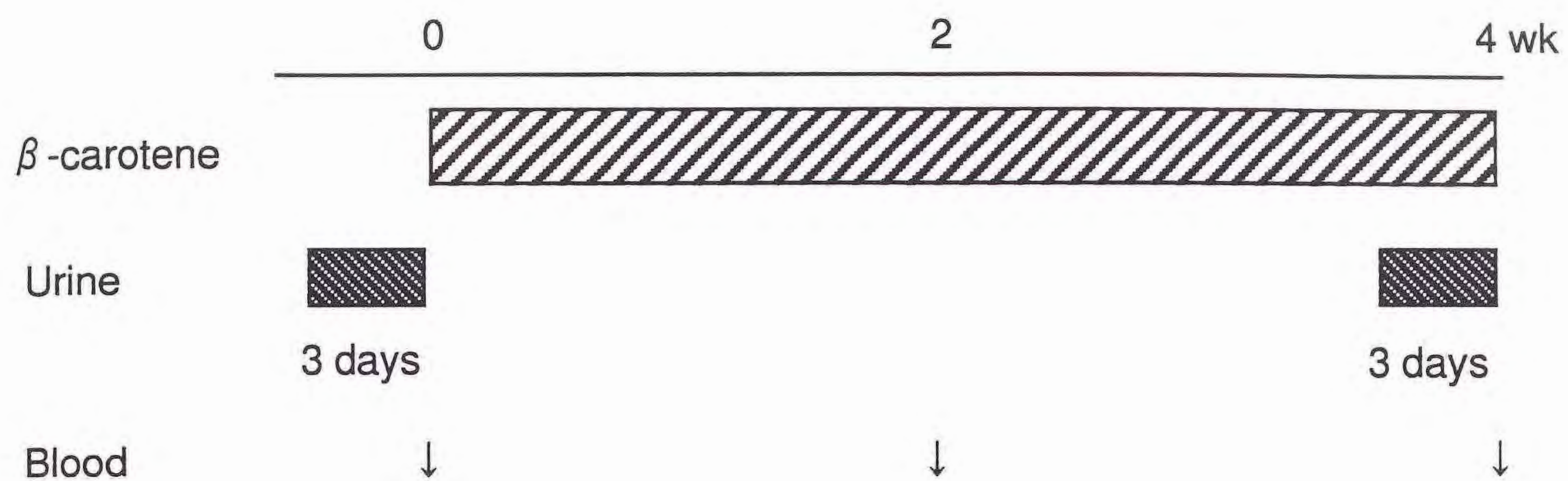


Fig. 3-4-1 Outline of experimental protocol

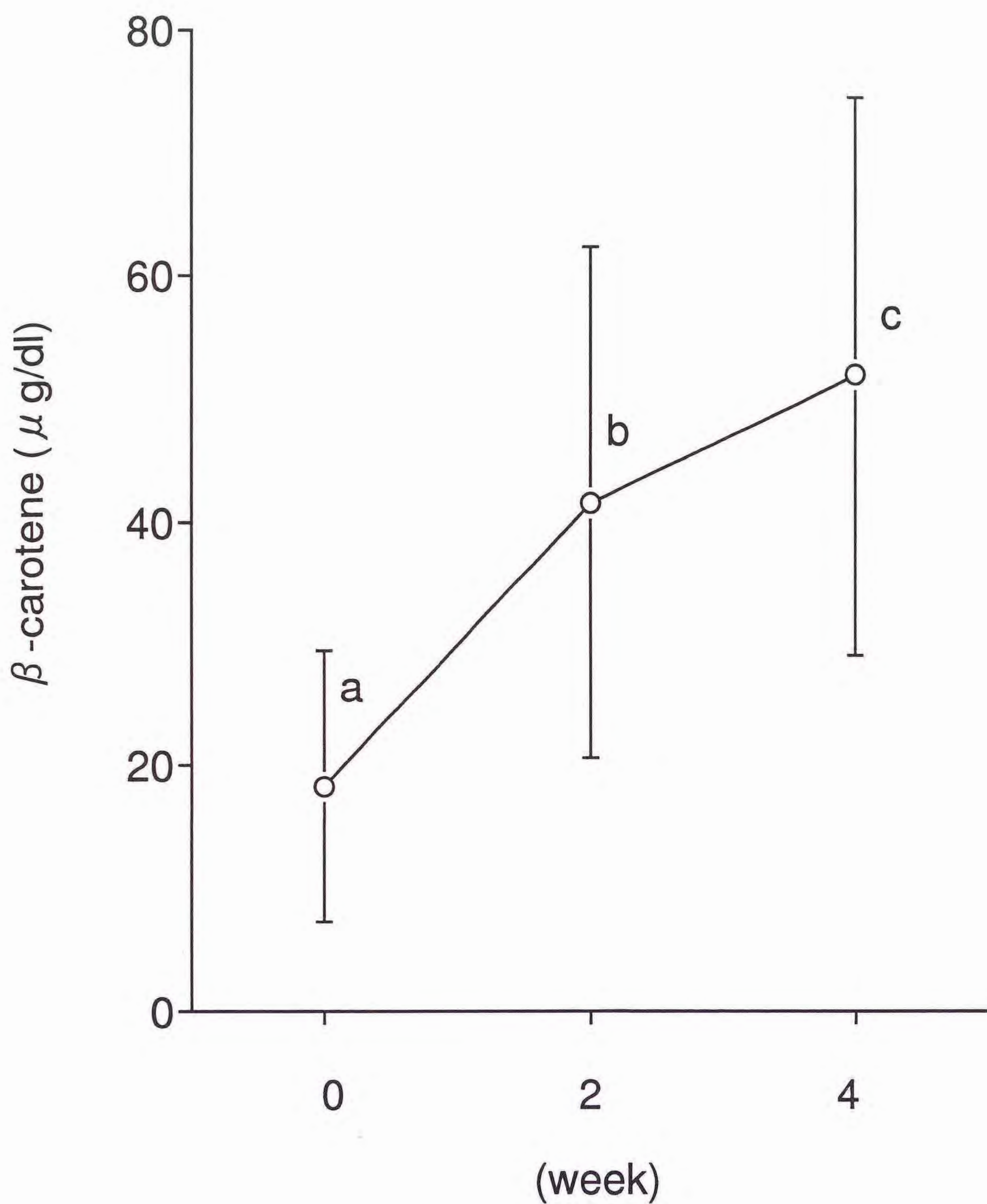


Fig. 3-4-2 Plasma β -carotene concentration. Means \pm SD for 90 subjects. Values with different letters are significantly different.

Table 3-4-1 The urinary excretion of 8-OHdG and TBARS.

	Week 0	Week 4
8-OHdG (nmol/g creatinine)	16.0 \pm 4.7	15.2 \pm 4.5
TBARS (μ g/g creatinine)	0.758 \pm 0.179 (41/59)	0.748 \pm 0.168 (36/59)

Values are the means \pm SD for 59 subjects. The numbers in parentheses indicate the number of subjects whose TBARS in the urine were above the measurement limits.

尿中成分は対応のある t-検定で比較した。P<0.05 を有意とした。

研究結果

β-カロテン摂取量

期間中の飲料の平均摂取量は 634 ± 140 ml/ 日であったので、飲料からの β-カロテン摂取量は 3.8 mg/日であった。

血漿 β-カロテン濃度 (Fig. 3-4-2)

血漿 β-カロテン濃度は、摂取前値に対して 2 週目、4 週目に有意に上昇した。

尿中 8-OHdG および TBARS 排泄 (Table 3-4-1)

尿中 8-OHdG 排泄量は、4 週間の摂取期間後に減少する傾向が認められた (P=0.08)。尿中 TBARS 排泄量には摂取期間の前後で有意な変化を認めなかった。また、定量限界 (1.0 nmol/ml) 以上の値を示した例数は、摂取前の 41 例から摂取後に 36 例と減少していたが、 χ^2 検定の結果、頻度には有意差は認められなかった。

考察

一日あたり 3.8 mg の β-カロテンを 4 週間摂取することによって、血漿 β-カロテン濃度は、摂取前の 18.4 μ g/dl から 4 週間後に 51.9 μ g/dl へ上昇した。本章第 2 節では、3.0 mg の β-カロテンを 3 週間摂取させ、3 週間後の血漿濃度は 51 μ g/dl で、本研究と同レベルであった。本研究では摂取 2 週目から 4 週目にかけて血漿 β-カロテン濃度が上昇したが、4 週目にはほぼプラトーに達していたと推測される。

著者らは、日本人の食事からの β-カロテン摂取量を、緑黄色野菜の摂取量から試算した結果、約 2.5 mg 程度との値を得ている。β-カロテンの摂取推奨量は 6 mg なので、本研究における β-カロテン摂取量と食事からの摂取量とで、およそ推奨量になっていたと推察される。このように、本研究での摂取量は現実的な摂取量だったと考えられる。

尿中 8-OHdG 排泄量は酸素消費量に比例していることが、ヒト¹⁰⁷⁾ および動物^{54, 55)} において認められている。日常的にスポーツ活動をおこなっている人ではスポー

ッをしていない人にくらべて、酸素消費量が多いと考えられる。しかし、尿中 8-OHdG 排泄量には、習慣的にランニングをおこなっている人と運動していない人とで、差がないという報告がある¹¹¹⁾。一方、第2章第4節で観察したように、鍛練者でも激しい運動をくりかえしおこなうことによって、尿中 8-OHdG 排泄が増加する場合があると考えられる。

尿中 8-OHdG 排泄量と α -トコフェロール、アスコルビン酸そして β -カロテンの摂取量とには、相関関係がないと報告されている⁴⁶⁾。本研究では4週間の実験期間後に、尿中 8-OHdG 排泄量が減少する傾向が認められた。このことは、 β -カロテンを継続的に摂取することによって、DNAの酸化的損傷が低減された可能性を示唆している。本研究では実験期間中の運動量には制限は加えず、対象者に通常の運動量を維持するように依頼した。したがって、実験期間中の運動量が減少したために、尿中 8-OHdG 排泄量が低下傾向を示した可能性も除外できない。 β -カロテンの作用を明らかにするためには、 β -カロテンの摂取量を増加し、対照群を設けた実験が必要と考えられた。

要約

日常的に運動トレーニングをおこなっていて、酸化ストレスに曝される危険性の高いと考えられる運動選手に、3.8 mg/日の β -カロテンを4週間摂取させた。その結果、血漿 β -カロテン濃度は摂取期間中に有意に(2.7倍)上昇した。尿中 TBARS 排泄は摂取期間前後で変化しなかった。しかし、8-OHdG 排泄量が摂取期間後に低下する傾向を示したことから、 β -カロテンを摂取することによってDNAの酸化的損傷が低減された可能性が示唆された。

第5節 30 mg、4週間摂取後の漸増負荷運動に対する影響

第4節で観察された、 β -カロテンの尿中 8-OHdG 排泄を減少させる可能性について、 β -カロテンの摂取量を増加させ、対照群を設けて検討した。運動による組織損傷に対する β -カロテンの作用についても併せて検討した。

研究1 (Fig. 3-5-1)

対象；大学陸上部の男子長距離選手 11 名を、対照群 (C 群) 5 名と β -カロテン群 (B 群) 6 名に分けた。B 群の対象者は、年齢 20.8 ± 1.9 才、身長 170.0 ± 0.02 cm、体重 58.3 ± 2.4 kg、最大酸素摂取量は 61.3 ± 1.1 ml/kg/min だった。C 群の対象者は、年齢 20.6 ± 1.3 才、身長 171.0 ± 0.03 cm、体重 59.0 ± 1.6 kg、最大酸素摂取量は 60.1 ± 0.7 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的および想定される利益ならびに危険性を説明し、同意書を得た。

被験物投与；B 群には β -カロテンを 10mg 含むカプセルを一日 3 回、毎食後に摂取させた。C 群にはプラセボを同様に摂取させた。摂取期間は 4 週間とした。実験は二重盲検法によりおこなった。

運動負荷方法；摂取期間終了後にトレッドミルを用い、傾斜 0% で 180 m/min のスピードから開始し、2 分ごとに 10 m/min 増加させて疲労困憊に至る運動負荷実験をおこなった。

採血および採尿；運動前および運動の直後、3 時間後および 24 時間に採血した。また、摂取期間前の 1 日と摂取期間後におこなった運動負荷実験の前日の全尿を採取した。

測定項目；血漿 β -カロテン (HPLC 法)、CK (CPK-II テストワコー、和光純薬工業株)、ミオグロビン (ミオグロビンキット「第一」II、第一アイソトープ) 濃度を測定した。また、尿中 8-OHdG (HPLC-ECD 法) およびクレアチニン (クリニメイト CRE キット、第一化学) を分析した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。群間の比較は t-検定をおこない、尿中 8-OHdG 排泄量の実験期間前後に比較は対応のある t-検定によっておこなった。P<0.05 を有意とした。

研究 2 (Fig. 3-5-1)

対象；日常定期的に運動を実施していない、健康で喫煙習慣のない男性 15 名を対照群 (C 群) 6 名と β -カロテン群 (B 群) 8 名に分けた。B 群の対象者は、年齢 19.9 ± 0.4 才、身長 167.8 ± 1.7 cm、体重 58.1 ± 2.9 kg、最大酸素摂取量は 38.9 ± 2.2 ml/kg/min だった。C 群の対象者は、年齢 19.8 ± 0.3 才、身長 171.7 ± 2.5 cm、体重 61.9 ± 3.8 kg、最大酸素摂取量は 37.5 ± 2.2 ml/kg/min だった。対象者には実験に先立って、実験目的および想定される利益ならびに危険性を説明し、同意書を得た。

被験物投与；B 群には β -カロテンを 10mg 含むカプセルを一日 3 回、毎食後に摂取させた。C 群にはプラセボを同様に摂取させた。摂取期間は 4 週間とした。実験は二重盲検法によりおこなった。

運動負荷方法；摂取期間終了後に自転車エルゴメーターを用い 3 分間の座位安静の後、20W で 4 分間のウォーミングアップをおこない、その後 3 分ごとに 20W の負荷漸増法により疲労困憊に至る運動負荷実験をおこなった

採血および採尿；運動前および運動の直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に採血した。また、摂取期間前の 1 日と摂取期間後におこなった運動負荷実験の前日の全尿を採取した。

測定項目；血漿 β -カロテン (HPLC 法)、アスコルビン酸 (HPLC 法)、 α -トコフェロール (HPLC 法)、LDH (LDH-HR、和光純薬工業株)、CK (CPK-II テストワコー、和光純薬工業株)、GOT (GOT-UV テストワコー、和光純薬工業株)、GPT

(GPT-UV テストワコー、和光純薬工業株) の濃度を測定した。また、尿中 8-OHdG (HPLC-ECD 法) およびクレアチニン (クリニメイト CRE キット、第一化学) 濃度を測定した。

統計処理；一元配置の分散分析をおこない、有意性の認められた場合に Bonferroni test をおこなった。群間の比較は t-検定をおこない、尿中 8-OHdG 排泄量の実験期間前後の比較は対応のある t-検定によっておこなった。P<0.05 を有意とした。

研究結果

研究 1

血漿 β -カロテン濃度 (Fig. 3-5-2)

血漿 β -カロテン濃度は、B 群で C 群よりも有意な高値にあった。血漿 β -カロテン濃度は、C 群で運動直後に有意に低下し、B 群でも低下傾向にあった。

血漿 CK およびミオグロビン濃度 (Fig. 3-5-3)

血漿 CK は運動直後に両群で増加する傾向が認められたが、群間に差は認められなかった。血漿ミオグロビンは3時間後まで有意に上昇した後、24時間後には低下した。血漿ミオグロビンには群間に差はなかった。

尿中 8-OHdG 排泄 (Fig. 3-5-6A)

尿中 8-OHdG 排泄は、4 週間の摂取期間後に B 群で摂取前にくらべて有意に減少した。C 群では変化は認められなかった。

研究 2

血漿 β -カロテン、 α -トコフェロール、アスコルビン酸濃度 (Fig. 3-5-4)

血漿 β -カロテン濃度は、B 群で C 群よりも有意な高値にあった。血漿 β -カロテン濃度は、両群で運動直後に有意に低下した。血漿 α -トコフェロール濃度は運動直後に両群で有意に上昇したが、いずれの時点でも群間に差は認められなかった。血

	Subject	β -carotene (30 mg/d)	Placebo	Period	Exercise test
Study 1	Trained	6	5	4 wk	Treadmill run until exhaustion
Study 2	Untrained	8	6	4 wk	Cycle ergometer until exhaustion

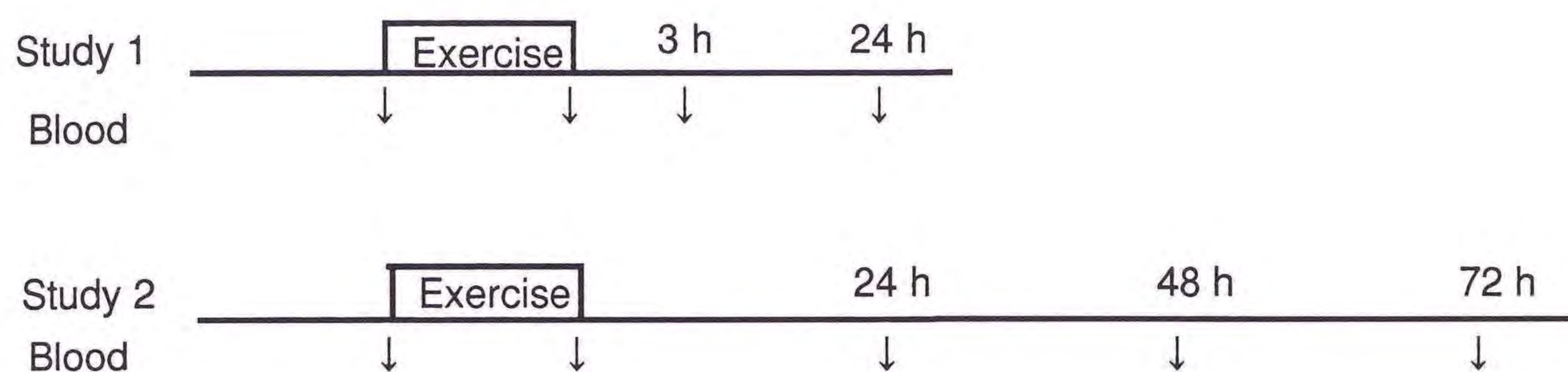


Fig. 3-5-1 Outline of experimental design

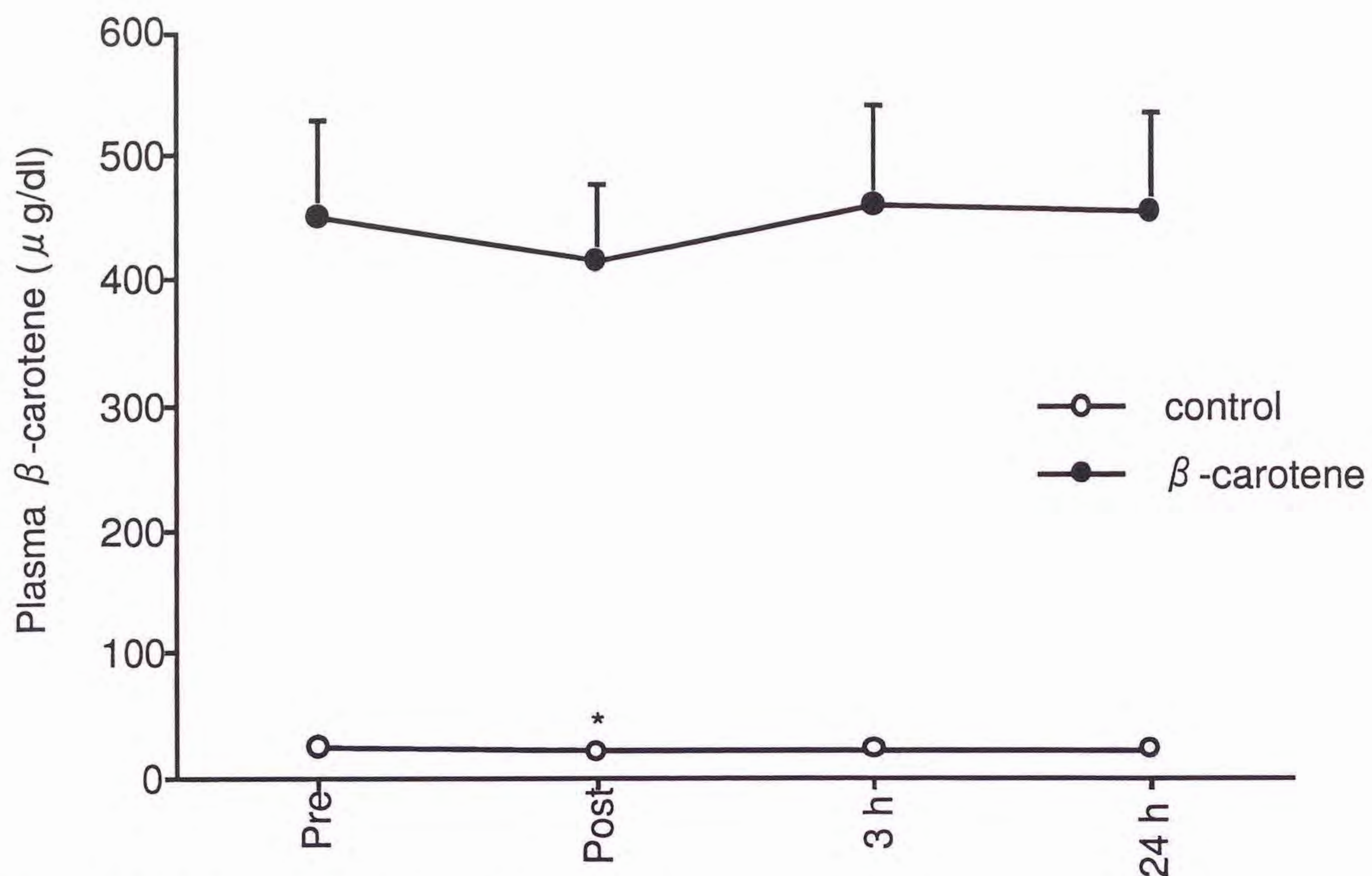


Fig. 3-5-2 Effect of 4 week ingestion of 30 mg β -carotene on exercise-induced changes in plasma β -carotene in trained subjects. Means \pm SE. β -carotene, n=6, control, n=5. * $P < 0.05$ vs Pre.

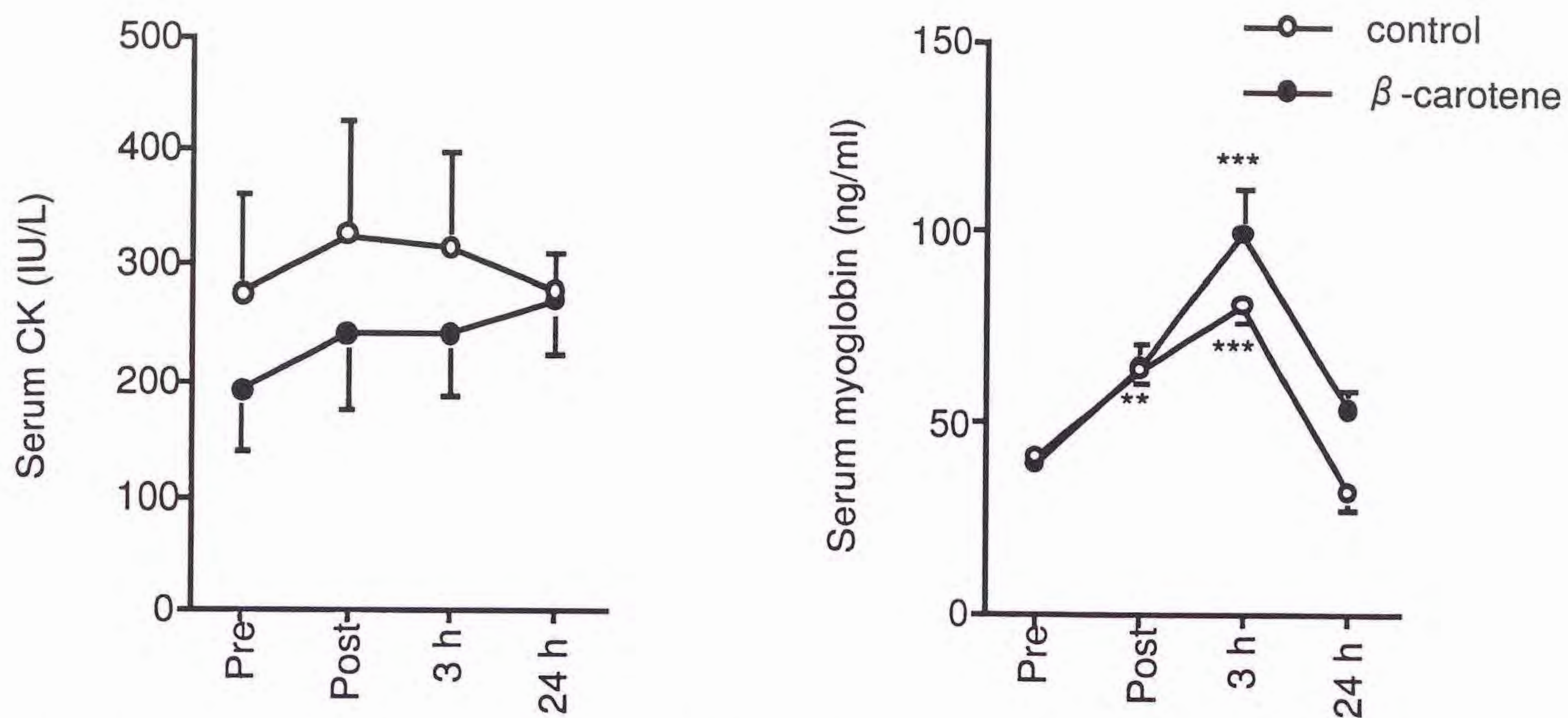


Fig. 3-5-3 Effect of 4 week ingestion of 30 mg β -carotene on exercise-induced changes in serum CK and myoglobin in trained subjects. Means \pm SE. β -carotene, n=6, control, n=5. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Pre.

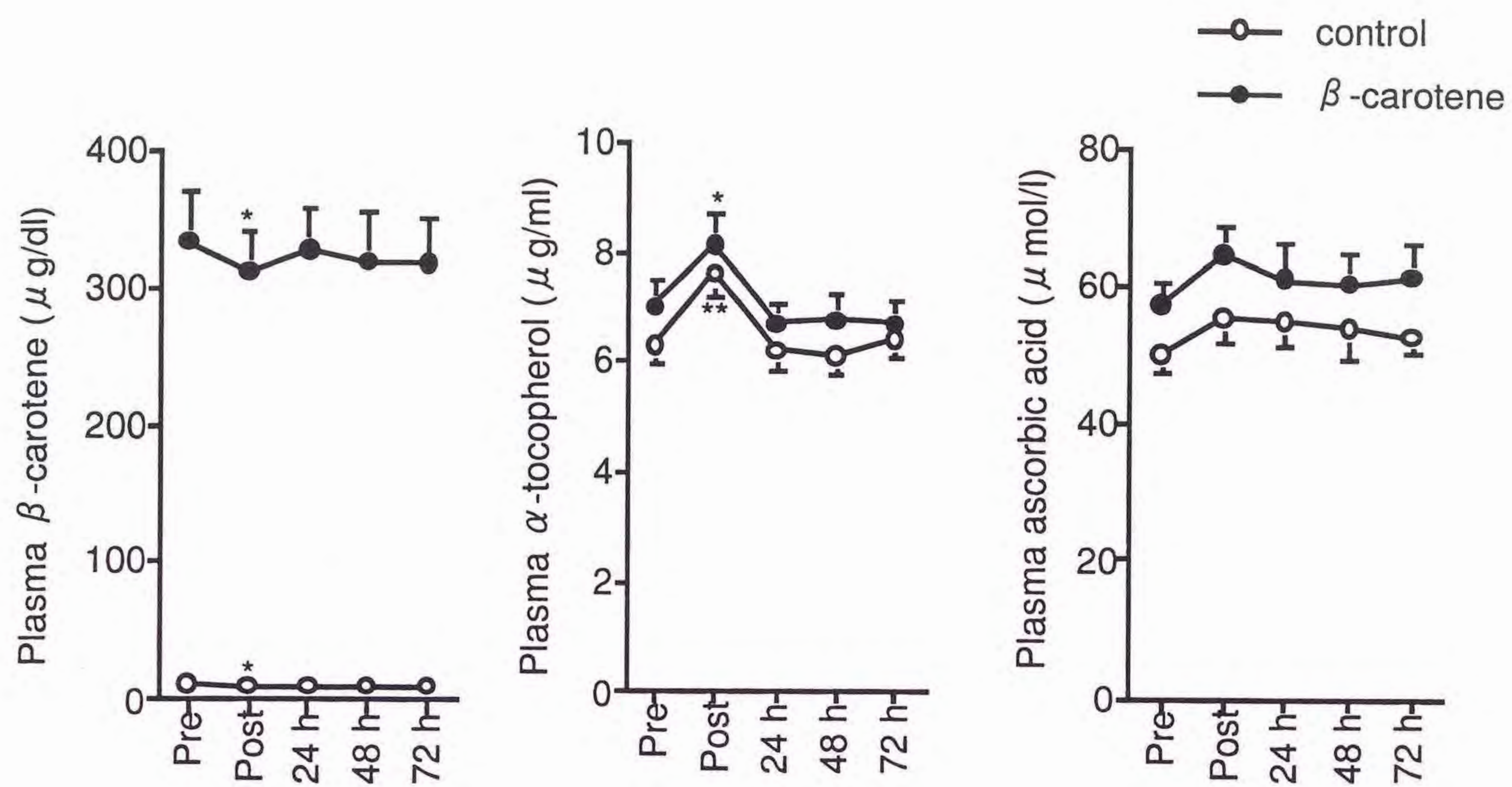


Fig. 3-5-4 Effect of 4 week ingestion of 30 mg β -carotene on exercise-induced changes in plasma antioxidant vitamins in untrained subjects. Means \pm SE. β -carotene, n=8, control, n=6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Pre.

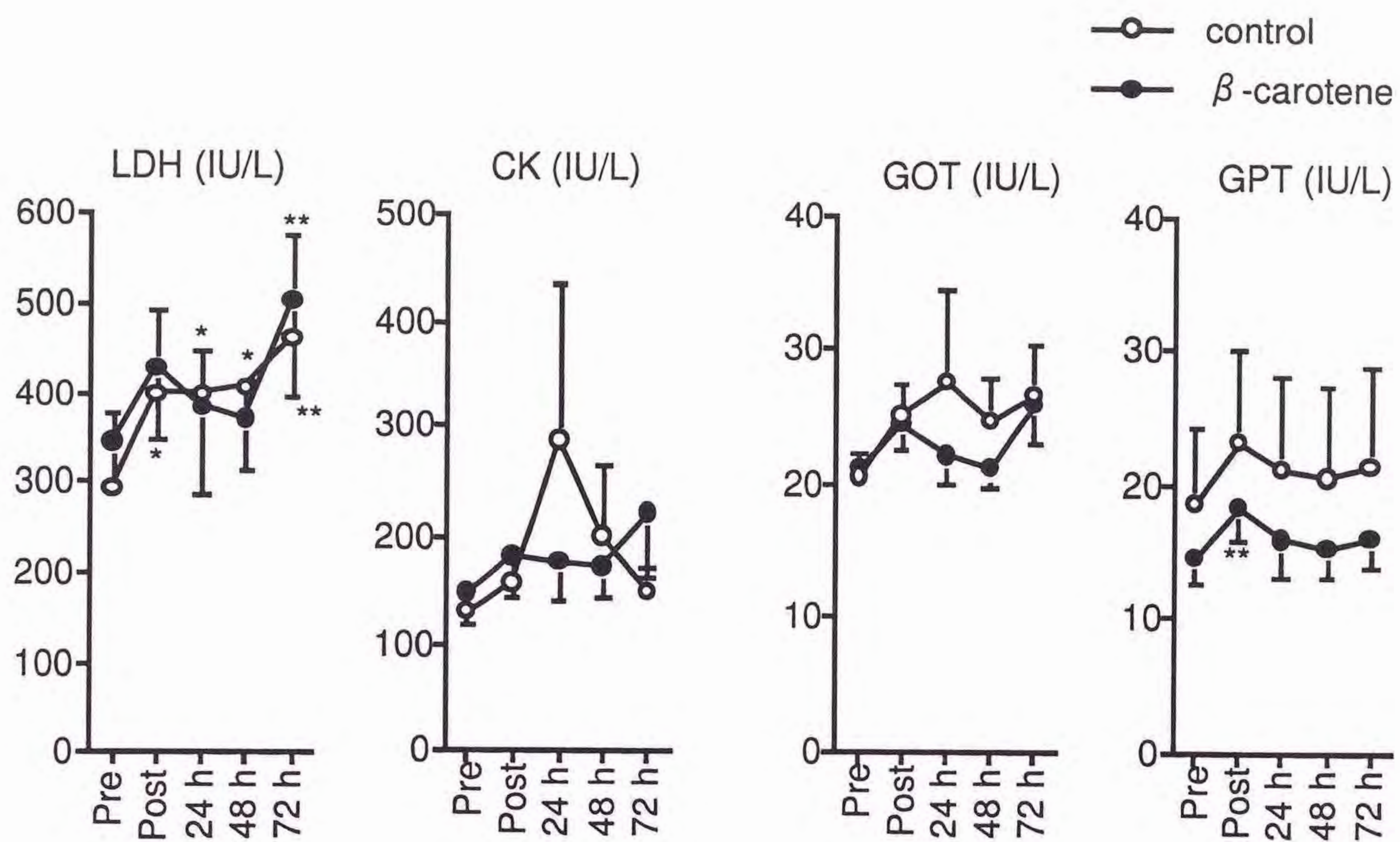


Fig. 3-5-5 Effect of 4 week ingestion of 30 mg β -carotene on exercise-induced changes in serum CK and myoglobin in untrained subjects. Means \pm SE. β -carotene, n=8, control, n=6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Pre.

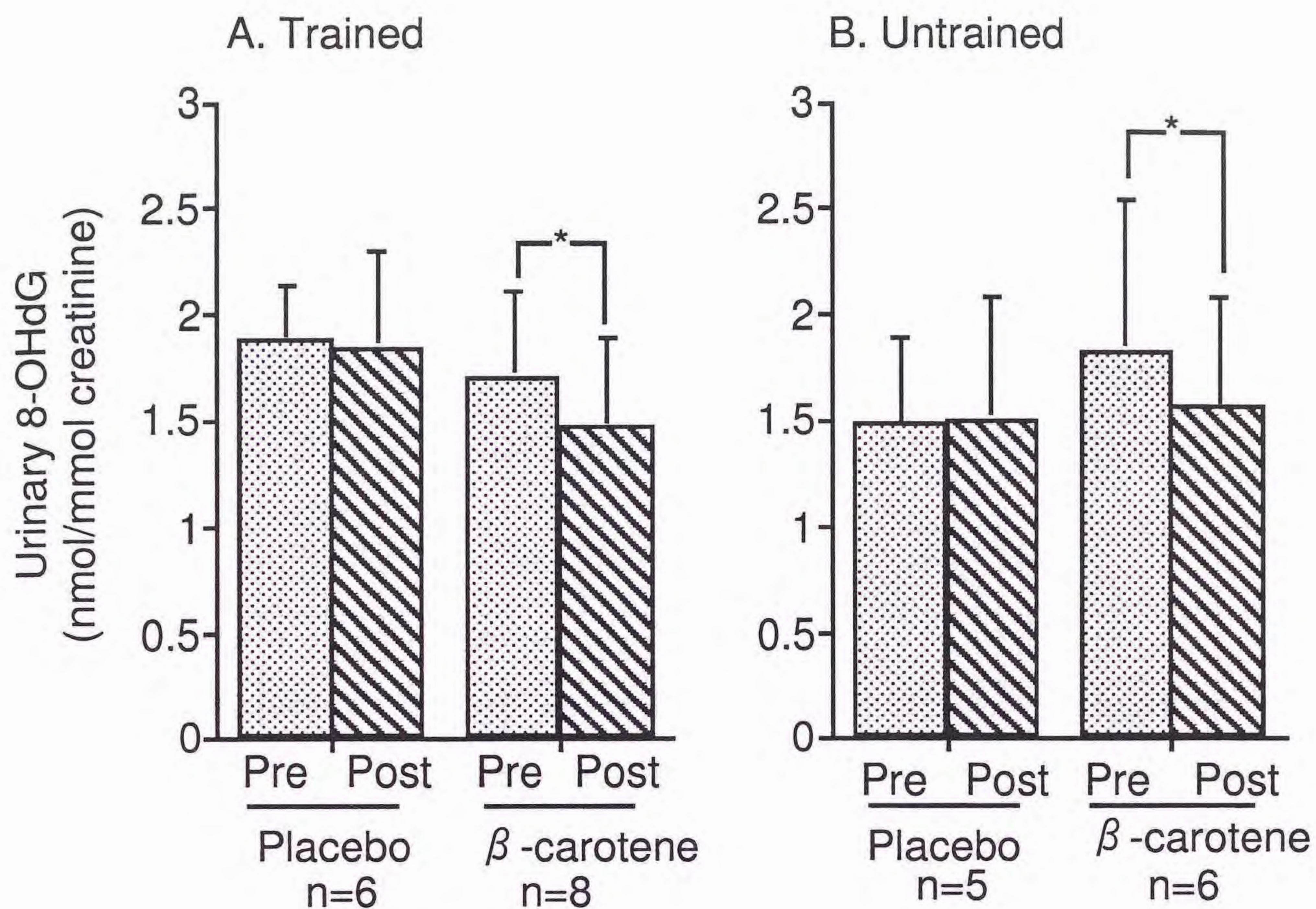


Fig. 3-5-6 Effect of 4 week supplementation of 30 mg/day β -carotene on urinary 8-OHdG excretion in both trained (A) and untrained (B) subjects. Means \pm SD. * $P < 0.05$ vs Pre in each treatment.

漿アスコルビン酸濃度は運動直後に両群で上昇する傾向が認められた。しかし、アスコルビン酸濃度にはいずれの時点でも群間に有意差はなかった。

血漿 LDH、CK、GOT および GPT 濃度 (Fig. 3-5-5)

血漿 LDH 濃度は両群で運動後に上昇したが、群間に差は認められなかった。血漿 CK、GOT 濃度は運動後に上昇傾向を示したが、群間に差は認められなかった。血漿 GPT 濃度は B 群で運動直後に有意に上昇し、C 群でも上昇傾向を認めたが、群間に差は認められなかった。

尿中 8-OHdG 排泄 (Fig. 3-5-6B)

尿中 8-OHdG 排泄は 4 週間の摂取期間後に B 群で摂取前にくらべて有意に減少した。C 群では変化は認められなかった。

考察

一日あたり 30 mg の β -カロテンを摂取することで、血漿 β -カロテン濃度は約 20 倍に上昇した。本研究で用いた β -カロテン摂取量は β -カロテンの介入試験で用いられた量である^{130, 131, 132)}。30 mg/day を 3 ヶ月摂取させた研究では、血漿 β -カロテン濃度は摂取前の 40.3 μ g/dl から摂取期間後に 504.6 μ g/dl へ上昇した¹³³⁾。45 mg/day の β -カロテンを 3 週間摂取させた研究で、血漿 β -カロテン濃度の応答には個人差があり、最も上昇した対象者での上昇は 172 μ g/dl だったのに対して、最も上昇の小さかった対象者での上昇は 59 μ g/dl だった¹³⁴⁾。さらに大量の 120 mg を投与すると 4 週間後に血漿濃度が 500 μ g/dl 以上に上昇した¹²⁷⁾。一方、300mg を 3 週間投与したとき、血漿 β -カロテン濃度は 39 μ g/dl から 338 μ g/dl へ上昇したと報告されている¹³⁵⁾。本研究における 4 週間の摂取期間後の濃度は、鍛練者では 451 μ g/dl、非鍛練者では 334 μ g/dl でほぼ先行研究の結果と一致した。

組織損傷の指標の血中逸脱物には、4 週間の摂取期間後および運動後において、群間で有意な差は認められず、 β -カロテン補給によって組織損傷が低減されなかった。この結果は、本章第 2 節で、 β -カロテン摂取後に組織損傷が低減された結果と矛盾する。なぜ結果が異なったのか理由は不明だが、本章第 3 節において、 β -カ

ロテンがトリアスロンによる組織損傷を軽減しなかったことを考えると、本研究での対象者の摂取期間中のトレーニングが、第2節の対象者よりも強かったことなどが要因として考えられる。

本研究で、血漿 β -カロテン濃度は対照の20倍程度に上昇しても運動後に低下し、アスコルビン酸や α -トコフェロールが運動後に上昇するのとは異なっていた。このことは、本章第2節で考察したように、 β -カロテンの消費が非常に早く貯蔵部位からの動員が追いつかなかったこと、あるいは動員されにくかったことを示唆している。運動時に β -カロテンを消費している部位についてはまったく不明である。 β -カロテンは一重項酸素のスキャベンジャーなので、紫外線によって一重項酸素が生成する皮膚で消費されると推測される。しかし、本研究は室内でおこなったので皮膚での一重項酸素の消去に利用されたとは考えられない。

本研究で、最も興味深い結果は、安静時の尿中8-OHdG排泄が4週間の β -カロテン摂取後に有意に減少したことである。これは、第4節で3.8 mgの β -カロテンを4週間摂取した後に、尿中8-OHdG排泄量が減少する傾向を示したものと一致する結果である。これらの結果は、血漿 β -カロテン濃度を高く維持しておくことが、DNAの酸化傷害を低減する可能性を示している。

8-OHdGに対する抗酸化ビタミンの影響について、 α -トコフェロール投与はラット肝臓DNA中の8-OHdG量に影響を及ぼさないが¹³⁶⁾、2-nitropropaneで処理したラットに緑茶を飲料水として投与することによって、尿中8-OHdGレベルが低下したと報告されている¹³⁷⁾。また、 β -カロテンがディーゼルの排ガス粒子によって上昇するマウス肺DNA中の8-OHdG/dG比を、有意ではないが低下したことが報告されている¹³⁸⁾。ヒトを対象にした β -カロテン補給の8-OHdGに対する影響に関する報告は見あたらず、本研究で得られた結果は β -カロテンの抗酸化作用として興味あるものである。この作用が生体にとってどのような生理的意義をもつのかは今後の研究課題である。

要約

30 mg/日の β -カロテンを4週間投与し、運動時の組織損傷および安静時の8-

OHdG 排泄に及ぼす影響を検討した。

β -カロテン投与によって血漿 β -カロテン濃度は対照群の約 20 倍に上昇した。運動による血漿逸脱物の上昇には対照群と差がなく、運動による組織損傷には影響を及ぼさなかった。尿中 8-OHdG 排泄量は β -カロテン群で摂取期間後に有意に減少したのに対して、対照群では摂取期間前後で差が認められなかった。

この結果から、 β -カロテンを継続摂取することによって、DNA の酸化的損傷が低減されたことが示唆された。

総括

運動が生活習慣病の予防や改善、健康の維持・増進に有効なことは広く認識されている。また、スポーツは現代社会では文化の一分野として欠くことができなくなっている。しかし、一方で運動時に体内での生成が増加すると考えられている活性酸素による傷害が、運動の弊害として懸念されている。

生体には、活性酸素を処理する種々の酵素系や抗酸化物質が存在している。しかし、激しい運動によって活性酸素の生成が処理能を上回る場合のあることが推測されている。このようなときには体外から抗酸化物質を補給する必要があると考えられる。

α -トコフェロール、アスコルビン酸、 β -カロテンは抗酸化ビタミンと呼ばれ、これらのうち α -トコフェロールとアスコルビン酸とは、運動時の抗酸化能が広く検討されてきた。しかし、近年注目されている β -カロテンの、運動時による酸化傷害に対する効果はほとんど知られていない。 β -カロテンの作用に関する研究が進んでいない理由として、 β -カロテンをそのまま吸収し体内に蓄積する動物が、ヒトを含む霊長類の他で実験に使用できるのがフェレットだけであり^{85, 128, 139)}、栄養実験でよく利用されるマウス、ラットが使えなかったことがあげられる。そこで本論文でも必然的にヒトを対象とした研究が主になった。

活性酸素によって傷害される生体成分としては、その生理的な重要性もあって膜の脂質がよく検討されてきた。一方、活性酸素によって傷害されるきわめて重要な生体成分に DNA があり、最近になってその酸化傷害が 8-OHdG を指標として測定されるようになった。しかし、運動による 8-OHdG の変化についてはほとんど知見がなかった。

そこで本論文では、 β -カロテンの運動による酸化傷害に対する影響について、従来の指標に 8-OHdG を加えて検討した。

第 1 章では、強度および時間の異なるいくつかの運動において、酸化ストレス、組織傷害ならびに血中抗酸化ビタミン濃度の変化を検討した。その結果、運動時には活性酸素の生成が増大していることが示唆された。また、運動による組織傷害は運動強度に依存して増大することが認められた。血中アスコルビン酸、 α -トコフェ

ロール、尿酸濃度が運動によって上昇したことから、運動時には抗酸化能を高めようとする生体応答が働いている可能性が認められた。しかし、血漿 β -カロテン濃度は低下し、他の抗酸化物質とは異なった変化をすることを認めた。この β -カロテンの応答についてはこれまでに報告がない。運動時に酸素消費量の増大する筋肉が、 β -カロテンの消費が増加した部位である可能性が考えられる。しかし、血漿 β -カロテン濃度が低下する理由および生理的な意義は今後の検討課題と思われる。また、血中の抗酸化能が高まっていたにもかかわらず組織損傷が起きたことは、運動時には抗酸化物質の必要量が高まっていたことを示唆するものと考えられた。

第2章では、DNAの酸化的損傷に対する運動の影響を、尿中8-OHdG排泄量および組織DNA中8-OHdG含量を指標として、強度および時間の異なる運動において検討した。その結果、30分程度で一過性に疲労困憊に至る運動ではDNAの酸化的損傷は起きないことが認められた。また、20 km ランニングという強度が高く時間も長い運動でも、DNAの酸化的損傷は認められなかった。しかし、連日平均30kmも走るような条件下では尿中8-OHdG排泄量が増加し、DNAが酸化的損傷を受けることを認めた。このように、運動によるDNAの酸化的損傷は運動強度と時間に依存していることが認められた。

一方、組織およびリンパ球DNA中の8-OHdG含量に対する運動の影響を検討した結果、運動直後にはDNA中に8-OHdGは増加せず、むしろ減少傾向があった。このことは、運動によって8-OHdGの生成が増加しても、同時に除去が亢進することによって8-OHdGがDNA中に蓄積しないようにする機構が生体に存在すること示唆している。

第3章では、運動時の酸化傷害に対する β -カロテン補給の影響について検討した。第1章で認めたように、 β -カロテンだけが運動によって血中濃度が低下したことから、運動時に β -カロテンを補給することには意味があるように思われた。日常の食事から摂取出来る3mg程度の β -カロテンを継続摂取し、血中濃度を2.5倍程度に高めても運動による組織損傷を低減する効果は認められなかった。さらに、一日当たり30mgという大量を継続摂取させて、血中濃度を20倍に高めても運動による組織損傷を抑制しなかった。これらの結果から、 β -カロテンには運動による組織損傷

を抑制する効果はほとんどないことが示唆された。 α -トコフェロールが組織損傷を低減すること、それが膜脂質の過酸化を抑制することによって発揮されていることを考えると、 β -カロテンには膜脂質の過酸化を抑制する作用はなかったものと思われる。

しかし、本研究で注目した DNA の酸化的損傷に対しては、3.8 mg の β -カロテンを 4 週間継続摂取させることによって尿中 8-OHdG 排泄を減少させる傾向が認められた。この効果は、30 mg の β -カロテンを 4 週間摂取させた実験でさらに明らかとなった。遺伝情報の保存・伝達という DNA の機能を考えたとき、 β -カロテンの DNA 酸化傷害抑制作用は極めて重要といえる。激しい運動で DNA の酸化的損傷が増加するという第 2 章での結果を考慮すると、運動時の β -カロテン補給が重要なことが示唆される。

現代生活において、運動あるいはスポーツ活動はレジャー、健康の維持・増進、あるいは疾病の予防・改善などのさまざまな側面をもっている。この運動・スポーツ活動を安全かつ効果的に実践するための栄養処方として、抗酸化栄養素は重要な役割をもっているものと考えられる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御懇篤な御指導、御助言を賜りました大阪市立大学生活科学研究科、片山洋子教授に心から深謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、貴重な御助言を賜りました大阪市立大学生活科学研究科、湯浅勲教授、藤本繁夫教授に厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究に御協力、御援助をいただきました大阪学院大学、角田聡助教授に心からお礼申し上げます。

参考文献

1. R. Mitsuzono, K. Okamura, K. Igaki, K. Iwanaga, and M Sakurai. (1995) *Appl. Human Sci.*, 14, 125-131
2. T. Murakami, Y. Shimomura, N. Fujitsuka, M. Sokabe, K. Okamura, and S. Sakamoto (1997) *J. Appl. Physiol.*, 82, 772-775
3. K. Okamura, T. Doi, K. Hamada, M. Sakurai, K. Matsumoto, K. Imaizumi, Y. Yoshioka, S. Shimizu, and M. Suzuki (1997) *Am. J. Physiol.*, 272, E1023-E1030
4. K. Okamura, F. Matsubara, Y Yoshioka, N. Kikuchi, Y. Kikuchi, and H. Kohri (1987) *Japan. J. Pharmacol.*, 45, 243-248
5. 松原大、岡村浩嗣、井垣京子、勝村俊仁、下光輝一、岩根久夫 (1994) *運動生化学*, 6, 87-94
6. V. N. Singh (1992) *J. Nutr.*, 122, 760-765
7. R. Lovlin, W. Cottle, I. Pike, M. Kavanaugh, and A. N. Belcastro (1987) *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 56, 313-316
8. M. J. Jackson, R. H. T. Edwards, and M. C. R. Symons (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 847, 185-190
9. G.G. Corbucci, G. Montanari, M. B. Cooper, D. A. Jones, and R. H. T. Edwards (1984) *Int. J. Sports Med.*, 5, 135
10. K. J. A. Davies, A. T. Quintanilha, G. A. Brooks, and L. Packer (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107, 1198-1205
11. C. J. Dillards, R. E. Litov, W. M. Savin, E. E. Dumelin, and A. L. Tappel (1978) *J. Appl. Physiol.*, 45, 927-932
12. A. Boveris, E. Cadenas, and A. O. M. Shoppani (1976) *Biochem. J.*, 156, 435-444
13. P. S. Brady, P. K. Ku, and D. E. Ullrey (1978) *J. Animal. Sci.*, 47, 492-496
14. G. Loschen, A. Azzi, and L. Flohe (1973) *FEBS Lett.*, 33, 84-88
15. A. Bendich (1991) *Med. Sport. Sci.*, 32, 59-78
16. W. N. Stainby, W. F. Brechere, D. N. O'Drobnack, and J. K. Barclay (1989) *J. Appl. Physiol.*, 67, 2158-2162
17. J. M. McCord (1985) *N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163
18. J. A. R. Duarte, H-J. Appell, F. Carvalho, M. L. Bastos, and J. M. C. Soares (1993) *Int. J. Sports Med.*, 14, 440-443
19. S. Sumida, and Y. Sigawa-Katayama (1991) *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 10, 127-134
20. J. Pincemail, G. Camus, A. Roesgen, E. Dreezen, Y. Bertrand, M. Lismonde, G. Deby-Dupont, and C. Deby (1990) *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 61, 319-322
21. K. Suzuki, H. Sato, T. Kikuchi, T. Abe, S. Nakaji, K. Sugawara, M. Totsuka, K. Sato, and K. Yamaya (1996) *J. Appl. Physiol.*, 81, 1213-1222

22. J. A. R. Duarte, F. Carvalho, M. L. Bastos, J. M. C. Soares, and H-J. Appell (1993) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 68, 48-53
23. R. J. Maughan, A. E. Donnelly, M. Gleeson, P. H. Whiting, K. A. Walker, and P. J. Clough (1989) *Muscle Nerve*, 12, 332-336
24. S. Sumida, K. Tanaka, H. Kitao, and F. Nakadomo (1989) *Int. J. Biochem.*, 21, 835-838
25. C. Sen, M. Atalay, and O. Hänninen (1994) *J. Appl. Physiol.*, 77, 2177-2187
26. L. L. Ji, F. W. Stratman, and H. A. Lardy (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 263, 137-149
27. R. R. Jenkins, R. Friedland, and H. Howald (1984) *Int. J. Sports Med.*, 5, 11-14
28. M. Higuchi, L-J. Cartier, M. Chen, and J. O. Holloszy (1985) *J. Gerontol.*, 40, 281-286
29. H. M. Alessio, and A. H. Goldfarb (1988) *J. Appl. Physiol.*, 64, 1333-1336
30. P. Mena, M. Maynar, J. M. Gutierrez, J. Maynar, J. Timon, and J. E. Campillo (1991) *Int. J. Sports Med.*, 12, 563-566
31. S. K. Powers, D. Criswell, J. Lawler, L. L. Ji, D. Martin, R. A. Herb, and G. Dudley (1994) *Am. J. Physiol.*, 266, R375-R380
32. D. Criswell, S. Powers, S. Dodd, J. Lawler, W. Edwards, K. Renshler, and S. Grinton (1993) *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25, 1135-1140
33. R. R. Jenkins (1988) *Sports Med.*, 5, 156-170
34. L. Rokitzki, E. Logemann, A. N. Sagredos, M. Murphy, W. Wetzel-Roth, and J. Keul (1994) *Acta Physiol. Scand.*, 151, 149-158
35. P. S. Brady, L. J. Brady and D. E. Ullrey (1979) *J. Nutr.*, 109, 1103-1109
36. A. H. Goldfarb (1993) *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25, 232-236
37. M. M. Knater, L. A. Nottle, and J. O. Holloszy (1993) *J. Appl. Physiol.*, 74, 965-969
38. C. T. V. Kumar, K. Reddy, M. Prasad, K. Thyagaraju, and P. Reddanna (1992) *Mol. Cell. Biochem.*, 111, 109-115
39. M. Krotkiewski, Z. Brzezinska, B. Liu, and G. G. Palm (1994) *Scand. J. Med. Sports*, 4, 191-199
40. Z. Radak, K. Asano, M. Inoue, T. Kizaki, S. Oh-nishi, K. Suzuki, N. Taniguchi, and H. Ohno (1995) *J. Appl. Physiol.*, 79, 129-135
41. N. I. Krinsky (1989) *Free Rad. Biol. Med.*, 7, 617-635
42. H. Sies, and C. F. M. Menck (1992) *Mut. Res.*, 275, 367-375
43. C. A. Rice-Evans, J. Sampson, P. M. Bramley, and D. E. Holloway (1997) *Free Rad. Res.*, 26, 381-398
44. H. Kasai, H. Tanooka, and S. Nishimura (1984) *Gann*, 75, 1037-1039
45. H. Kasai, and S. Nishimura (1984) *Gann*, 75, 841-844
46. S. Loft, K. Vistisen, M. Ewertz, A. Tjønneland, K. Overvad, and H. E. Poulsen (1992)

Carcinogenesis, 13, 2241-2247

47. H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kurokawa, and Y. Hayashi (1987) Carcinogenesis, 8, 1959-1961
48. C. Richter, J. W. Park, and B. N. Ames (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 6465-6467
49. E. S. Fiala, C. C. Conway, and J. E. Mathis (1989) Cancer Res., 49, 5518-5522
50. C. A. Viguie, B. Frei, M. K. Shigenaga, B. N. Ames, L. Packer and G. A. Brooks (1993) J. Appl. Physiol., 75, 566-572.
51. E. H. Witt, A. Z. Reznik, C. A. Viguie, P. Starke-Reed and L. Packer (1992) J. Nutr., 122, 766-773.
52. A. M. Hartmann, A. M. Niess, M. Grunert-Fuchs, B. Poch, and G. Speit (1995) Mut. Res., 346, 195-202
53. A. M. Hartmann, U. Plappert, K. Raddatz, M. Grunert-Fuchs, and G. Speit (1994) Mutagenesis, 9, 269-272
54. R. Adelman, R. L. Saul, and B. N. Ames (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2706-2708
55. M.K. Shigenaga, C. J. Gimeno, and B. N. Ames (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9697-9701
56. J-Y. Mo, H. Maki, and M. Sekiguchi (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11021-11025
57. K. Sakumi, M. Furuichi, T. Tsuzuki, T. Kakuma, S. Kawabata, H. Maki, and M. Sekiguchi (1993) J. Biol. Chem., 268, 23524-23530
58. S. Agarwal, and H. H. Draper (1992) Free Rad. Res., 13, 695-699
59. B. Epe (1991) Chem. Biol. Intereact., 80, 239-260
60. R. R. Jenkins, K. Krause, and L. S. Schofield (1993) Med. Sci. Sports Exerc., 25, 213-217
61. A. Ben-Amotz, S. Mokady, S. Edelstein, and M. Avron (1989) J. Nutr., 119, 1013-1019
62. G. G. Duthie, J. D. Robertson, R. J. Maughan, and P. C. Morrice (1990) Arch. Biochem. Biophys., 282, 78-83
63. K. Sahkin, K. Ekberg, and C. Cizinsky (1991) Acta Physiol. Scand., 142, 275-281
64. S. R. J. Maxwell, P. Jakeman, H. Thompson, C. Leguen., and G. H. G. Thorpe (1993) Free Rad. Res. Comms., 19, 191-202
65. Y. Hellsten, B. Ekbolm, and B. Sjodin (1989) Acta Physiol. Scand., 137, 341-345
66. H. J. Green, and I. G. Fraser (1988) Med. Sci. Sports Exerc., 20, 55-59
67. N. Haramaki, and L. Packer (1994) In Exercise and oxygen toxicity (ed. C. K. Sen, L. Packer and O. Hannineu), Elsevier, Amsterdam, pp. 77-87.
68. H. M. Alessio, A. H. Goldfarb, and R. G. Cutler (1988) Am. J. Physiol., 255, C874-C877

69. M. M. Kanter, G. R. Lesmes, L. A. Kaminsky, J. La Ham-Saeger, and N. D. Nequin (1988) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57, 60-63
70. B. Dufaux, O. Heine, A. Kothe, U. Priz, and R. Rost (1997) *Int. J. Sports Med.*, 18, 89-93
71. J. Faff, and A. Frankiewicz-Jazko (1997) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 75, 413-417
72. D. D. Munjal, J. A. McFadden, P. A. Matix, K. D. Coffman, and S. M. Cattaneo (1983) *Clin. Biochem.*, 16, 195-199
73. N. Ortenblad, K. Madsen, and M. S. Djurhuus (1997) *Am. J. Physiol.*, 272, R1258-R1263
74. T. J. Vasankari, U. M. Kujala, T. M. Vasankari, T. Vuorimaa, and M. Ahotupa (1997) *Am. J. Clin. Nutr.*, 65, 1052-1056
75. J. Pincemail, C. Deby, G. Camus, F. Pirnay, R. Bouchez, L. Massaux, and R. Goutier (1988) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57, 189-191
76. M. Gleeson, J. D. Robertson, and M. J. Maughan (1987) *Clin. Sci.*, 73, 501- 505
77. J. G. Cannon, S. F. Orencole, R. A. Fielding, M. Meydani et al. (1990) *Am. J. Physiol.*, 259, R1214-R1219
78. B. Fishbaine, and G. Butterfield (1984) *J. Vitam. Nutr. Res.*, 54, 273
79. D. K. Bowles, C. E. Torgan, S. Ebner, J. P. Kehrer, J. L. Ivy, and J. W. Starnes (1991) *Free Rad. Res. Comms.*, 14, 139-143
80. J. D. Robertson, R. J. Maughan, G. G. Duthie, and P. C. Morrice (1991) *Clin. Sci.*, 80, 611-618
81. J. Vasankari, U. M. Kujala, H. Rusko, S. Sarna, and M. Ahotupa (1997) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 75, 396-399
82. T. J. Vasankari, U. M. Kujala, T. M. Vasankari, T. Vuorimaa, and M. Ahotupa (1997) *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 509-513
83. L. A. Kaplan, J. M. Lau, and E. A. Stein (1990) *Clin. Physiol. Biochem.*, 8, 1-10
84. W. Stahl, W. Schwarz, and A. R. Sudquist (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 173-177
85. J. D. Ribaya-Mercado, J. G. Fox, W. D. Rosenblad, M. C. Blanco, and R. M. Russel (1992) *J. Nutr.*, 122, 1898-1903
86. O. Helgheim, S. Hetland, S. Nilsson, F. Ingjer, and S. B. Stromme (1979) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 40, 283-289
87. J. Marnett, L. J. Buck, M. A. Tuttle, A. K. Basu, and A. W. Bull (1985) *Prostaglandins*, 30, 241-253
88. H. H. Draper, and M. Hadley (1990) *Xenobiotica*, 20, 901-907
89. M. Meydani, W. J. Evans, G. Hendelman, L. Biddie, R. A. Fielding, S. N. Meydani, J. Burrill, M. A. Fiatarone, J. B. Blumberg, and J. G. Cannon (1993) *Am. J. Physiol.*, 264,

90. E. Galun, R. Burstein, I. Tur-Kaspa, E. Assia, and Y. Epstein (1988) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57, 597-600
91. H. Ohno, S. Kayashima, N. Nagata, H. Yamashita, T. Ookawara, and N. Taniguchi (1993) *Clin. Chim. Acta*, 215, 213-219
92. W. H. Reinhart, M. Staubi, H. P. Kochli, and P. W. Straub (1982) *Clin. Chim. Acta*, 125, 307-310
93. M. M. Kanter, L. A. Kaminsky, J. L. Saegar, G. R. Lesmes, and N. D. Nequin (1986) *Ann. Sports Med.*, 3, 39-41
94. S. Kayashima, H. Ohno, T. Fujioka, N. Taniguchi, and N. Nagata (1995) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 70, 413-420
95. T. H. Diamond, R. Smith, A. P. Goldman, D. P. Myburgh, J. M. Block, and F. Visser (1983) *S. Afr. Med.*, 63, 37-41
96. K. M. Aikawa, A. T. Quintanilha, B. O. deLumen, G. A. Brooks, and L. Packer (1984) *Biosci. Rep.*, 4, 253-257
97. A. T. Quintanilha (1984) *Biosci. Soc. Trans.*, 12, 403-404
98. A. Salminen, and V. Vihko (1983) *Acta Physiol. Scand.*, 117, 109-113
99. J. W. Starnes, G. Cantu, R. P. Farrar, and J. P. Kehrer (1989) *J. Appl. Physiol.*, 67, 69-75
100. K. Gohil, L. Rothfuss, J. Lang, and L. Packer (1987) *J. Appl. Physiol.*, 63, 1638-1641
101. C. Haidet (1989) *Am. J. Physiol.*, 257, H1428-H1437
102. F. Yamamoto, H. Kasai, Y. Togashi, N. Takeichi, T. Hori, and S. Nishimura (1993) *Jap. J. Cancer Res.*, 84, 508-511
103. K. Okamura, T. Doi, M. Sakurai, K. Hamada, Y. Yoshioka, S. Sumida, and Y. Sugawa-Katayama (1997) *Free Rad. Res.*, 26, 523-528
104. T. Inoue, Z. Mu, K. Sumikawa, K. Adachi and T. Okochi (1993) *Jap. J. Cancer Res.*, 84, 720-725
105. 浅海信也、平野雄、山口雷蔵、伊藤英明、葛西宏 (1995) 日本癌学会総会記事、41amJ
106. H. M. Alessio (1993) *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25, 218-224
107. S. Loft, A. Astrup, B. Buemann, and H. E. Poulsen (1994) *FASEB J.*, 8, 534-537
108. G. Fraga, M. K. Shigenaga, J. W. Park, P. Degan and B. N. Ames (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 4533-4537.
109. W. F. Ganong (1989) *In The Review of Medical Physiology*, Lange, Norwalk, Connecticut, p. 514.
110. K. Okamura, T. Doi, K. Hamada, M. Sakurai, Y. Yoshioka, R. Mitsuzono, T. Migita, S. Sumida and Y. Sugawa-Katayama (1997) *Free Rad. Res.*, 26, 507-514

- 111.A. Pilger, D. Germadnik, D. Formanek, H. Zwick, M. Winkler, and H. W. Rudiger (1997) *Eur. J. Appl. Physiol.*, 75, 467-469
- 112.S. Loft, K. A. Fischer-Nielsen. I. B. Jeding, K. Vistise, and H. E. Poulsen (1993) *Tox. Envir. Health*, 40, 391-404
- 113.S. Shibutani, M. Takeshita, and A. P. Grollman (1991) *Nature*, 349, 431-434
- 114.P. Leanderson, P. Soderkvist, and P. Tagresson (1988) *Br. J. Ind. Med.*, 45, 309-311
- 115.K. S. Kasprzak, and L. Hrnandez (1989) *Cancer Res.*, 49, 5964-5968
- 116.山野優子、香川順、高橋東生 (1994) *日本衛生学会誌*, 49, 144
- 117.H. Kasai, Y. Okada, and S. Nishimura (1989) *Canser Res.*, 49, 2603-2605
- 118.山野優子、香川順、花岡友之 (1995) *Environ. Mut. Res. Commun.*, 16, 379-383
- 119.Y. Yamano, J. Kagawa, and J. Hanaoka (1995) *Environ. Res.*, 69, 102-107
- 120.T. Umemura, K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa, and Y. Kurokawa (1990) *Carcinogenesis*, 11, 345-347
- 121.K. Okamoto, S. Tomokuni, and K. Uchida (1994) *Int. J. Cancer*, 58, 825-829
- 122.B. Halliwell (1996) *Free Rad. Res.*, 25, 57-74.
- 123.E. D. Brown, M. S., Micozzi, N. E. Craft, J. G. Bieri, G. Beecher, B. K. Edwards, A. Rose, P. R. Talor, and J.. C. Smith (1989) *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 1258-1265
- 124.C. L. Rock, and M. E. Swendseid (1992) *Am. J. Clin. Nutr.*, 55, 96-99
- 125.S. B. Sugerman, S. Mobarhan, R. Kinai, H. Friedman, and D. Lucchesi (1991) *J. Am. Coll. Nutr.*, 10, 297-307
- 126.J. P. Costantino, L. H. Kuller, L. Begg, C. K. Redmond, and M. W. Bates (1988) *Am. J. Physiol.*, 48, 1277-1283
- 127.S. Morbarhan, P. Bowen, B. Andersen, M. Evans, M. Stacewicz-Sapuntzakis, S. Sugerman, P. Simms, D. Lucchesi, and H. Friedman (1990) *Nutr. Cancer*, 14, 195-206
- 128.J. D. Ribaya-Mercado, S. C. Holmgren, J. G. Fox, and R. M. Russell (1989) *J. Nutr.*, 119, 665-668
- 129.E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, and N. Gotoh (1995) *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1322S-1326S
- 130.G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thonogquist, J. Balmes, M. R. Cullen, A. Glass, J. P. Keogh, F. Meyskens, B. Valaris, J. H. Williams, S. Barnhart, and S. Hammar (1996) *N. Engl. J. Med.*, 334, 1150-1155
- 131.H. S. Garewal (1993) *Carotenoids in human health*. pp. 139-141, NY Academy of Sciences, New York.
- 132.T. Frommel, S. Mobarhan, M. Doria, A. Halline, G. Luk, P. Bowen, A. Candel, and Y. Liao (1995) *J. Natl. Cancer Inst.*, 57, 1781-1787
- 133.P. D. Reaven, A. Kkouw, W. F. Beltz, S. Parthasarathy, and J. L. Witztum (1993)

- Arter. Thromb., 13, 590-600
- 134.N. V. Dimitrov, C. Meyer, D. E. Ullrey, W. Chenoweth, A. Michelakis, W. Malone, C. Boone, and G. Fink (1988) Am. J. Clin. Nutr., 48, 298-304
- 135.M. R. Prince, J. K. Frisoli, M. M. Goetschkes, J. M. Stringham, and G. M. LaMuaglia (1991) J. Cardiovasc. Pharmacol., 17, 343-347
- 136.K. Umegaki, S. Ikegami, and T. Ichikawa (1993) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 39, 303-310
- 137.R. Hasegawa, T. Chujo, K. Sai-Kato, T. Uemura, A. Tanimura, and Y. Kurokawa (1995) Fd. Chem. Toxic., 33, 961-970
- 138.M. Nagashima, H. Kasai, J. Yokota, Y. Nagamachi, T. Ichinose, and M. Sagai (1995) Carcinogenesis, 16, 1441-1445
- 139.X-D. Wang, N. I. Krinsky, R. P. Marini, G. Tang, J. Yu, R. Hurley, J. G. Fox, and R. M. Russell (1992) Am. J. Physiol., 263, G480-G486

本論文に直接関係する論文

1. K. Okamura, F. Matsubara, Y. Yoshioka, N. Kikuchi, Y. Kikuchi and H. Kohri (1987) Japan J. Pharmacol., 45, 243-248. Exercise-induced changes in branched chain amino acid / aromatic amino acid in the rat brain and plasma.
2. 松原大、岡村浩嗣、井垣京子、勝村俊仁、下光輝一、岩根久夫 (1994) 運動生化学、6, 87-94. 持久運動時のアミノ酸代謝と中枢疲労
3. R. Mitsuzono, K. Okamura, K. Igaki, K. Iwanaga and M. Sakurai (1995) Applied Human Science, 14, 125-131. Effect of fructose ingestion on carbohydrate and lipid metabolism during prolonged exercise in distance runners.
4. T. Murakami, Y. Shimomura, N. Fujitsuka, M. Sokabe, K. Okamura and S. Sakamoto (1997) J. Appl. Physiol., 82, 772-775. Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose diet intake and exercise training.
5. K. Okamura, T. Doi, K. Hamada, M. Sakurai, Y. Yoshioka, R. Mitsuzono, T. Migita, S. Sumida and Y. Sugawa-Katayama (1997) Free Rad. Res., 26, 507-514
Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans.
6. K. Okamura, T. Doi, M. Sakurai, K. Hamada, Y. Yoshioka, S. Sumida and Y. Sugawa-Katayama (1997) Free Rad. Res., 26, 523-528. Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxydeoxyguanosine content in dogs.
7. K. Okamura, T. Doi, K. Hamada, M. Sakurai, K. Matsumoto, K. Imaizumi, Y. Yoshioka, S. Shimizu and M. Suzuki (1997) Am. J. Physiol., 272, E1023-E1030. Effect of amino acid and glucose administration during post-exercise recovery on protein kinetics in dogs.
8. S. Sumida, K. Okamura, T. Doi, M. Sakurai, Y. Yoshioka and Y. Sugawa-Katayama (1997) Biochem. Mol. Biol. Intern., 42, 601-609. No influence of a single bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans.

本論文に間接的に関係する論文

1. S. Moriguchi, N. Okishima, S. Sumida, K. Okamura, T. Doi and Y. Kishino (1996) Nutr. Res., 16, 211-218. β -carotene supplementation enhances lymphocyte proliferation with mitogens in human peripheral blood lymphocytes.